



Dynamique à l'équilibre et hors d'équilibre de la chromatine visualisée par microscopie de force atomique : effet des variants d'histones et des facteurs de remodelage

Fabien Montel

► To cite this version:

Fabien Montel. Dynamique à l'équilibre et hors d'équilibre de la chromatine visualisée par microscopie de force atomique : effet des variants d'histones et des facteurs de remodelage. Physique [physics]. Ecole normale supérieure de lyon - ENS LYON, 2008. Français. NNT : . tel-00358612

HAL Id: tel-00358612

<https://theses.hal.science/tel-00358612>

Submitted on 3 Feb 2009

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

N° d'ordre : 484

N° attribué par la bibliothèque : 07ENSL0 484

THÈSE

en vue d'obtenir le grade de

Docteur de l'Université de Lyon - Ecole Normale Supérieure de Lyon

Spécialité : Physique

Laboratoire Joliot-Curie

Ecole doctorale de Physique

présentée et soutenue publiquement le 24 octobre 2008

par Fabien MONTEL

Dynamique à l'équilibre et hors-équilibre de la chromatine visualisée par Microscopie à Force Atomique : effet des variants d'histone et des facteurs de remodelage.

Directeur de thèse : Madame Cendrine MOSKALENKO

Co-Directeur de thèse : Monsieur Stefan DIMITROV

Après avis de : Monsieur David BENSIMON, Membre/Rapporteur

Monsieur Christian MUCHARDT, Membre/Rapporteur

Devant la commission d'examen formée de :

Monsieur David BENSIMON, Membre/Rapporteur

Monsieur Stefan DIMITROV, Membre

Monsieur Ralf EVERAERS, Membre

Madame Cendrine MOSKALENKO, Membre

Monsieur Christian MUCHARDT, Membre/Rapporteur

Monsieur Jacques PROST, Membre/Président

*« Et l'école du monde en l'air dont il faut vivre,
instruit mieux, à mon gré, que ne fait aucun livre. »*

A mes parents, à mon frère et sa petite famille.

Remerciements

Avant toute chose je remercie les rapporteurs de ma thèse David Bensimon et Christian Muchardt d'avoir accepté de consacrer une partie de leur temps à la lecture et à la correction de ce manuscrit. Merci aussi à Jacques Prost et Ralf Everaers d'avoir accepté de participer à ce jury.

Je tiens ensuite à remercier particulièrement Cendrine pour avoir été bien plus qu'une simple directrice de thèse pendant tout le temps passé au laboratoire Joliot Curie. J'étais ton premier thésard mais seulement ton deuxième petit. Il va être bien difficile de travailler avec quelqu'un d'autre maintenant, j'ai pris trop de mauvaises habitudes... Pas la peine de m'étendre, je crois.

Je tiens évidemment à remercier mon co-directeur Stefan pour avoir fait le pari de travailler pendant 3 ans avec un physicien sur un sujet de biologie et d'en avoir accepté les contraintes. Merci aussi d'avoir été présent au long de ces projets en apportant constamment des idées neuves. J'espère qu'on peut dire aujourd'hui que le pari valait la peine.

Mes remerciements vont en outre à Dimitri pour avoir consacré de son temps à m'expliquer quelques-uns de ses petits secrets. Les longues conversations que nous avons eu sur (entre autres) les résultats des expériences ont toujours été éclairantes.

Merci aussi à Martin pour le temps passé à construire des modèles qui reproduisaient inévitablement (!) nos données et pour avoir accepté de relire certains de mes scripts tout bugués.

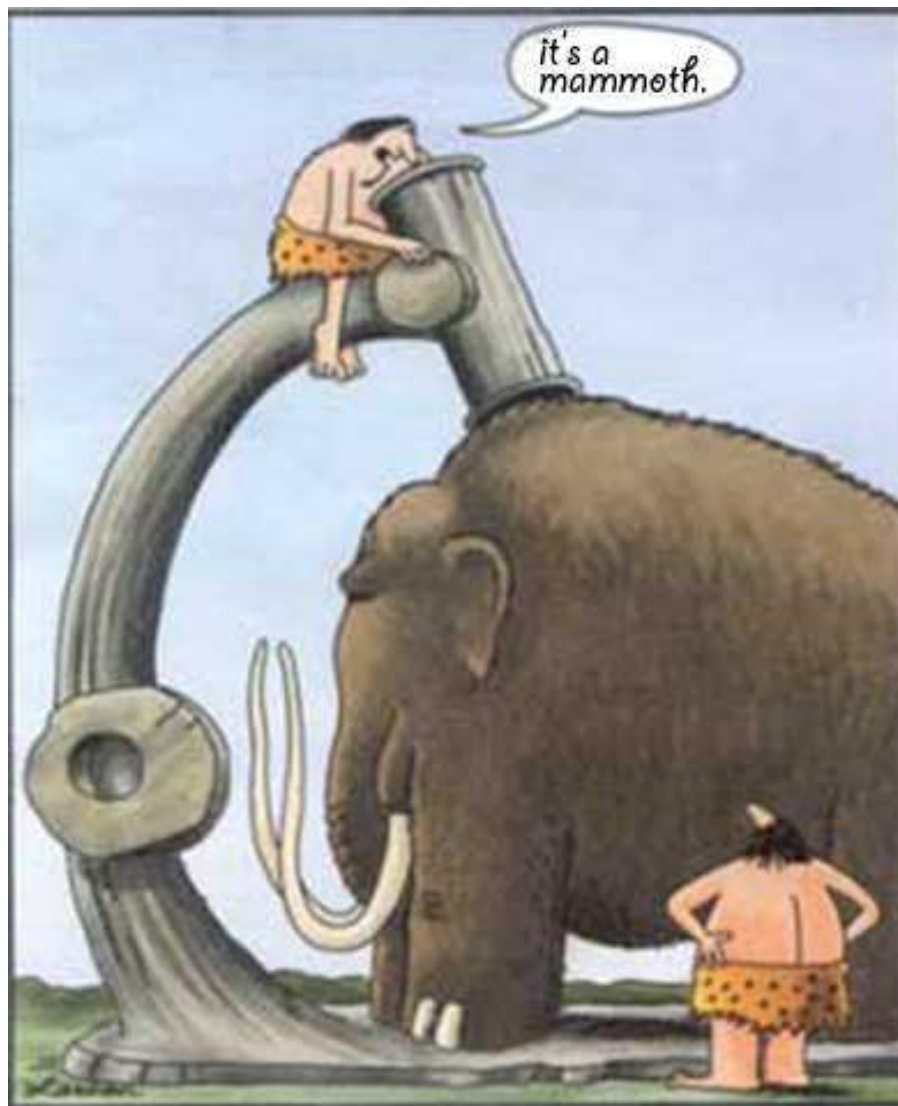
Difficile ensuite de regrouper les autres membres du labo tant ils m'ont apporté chacun à leur manière dans la vie de tous les jours.

Je remercierai d'abord les anciens locataires des paillasses du labo comme Mathieu, Hervé, Cécile, Corinne, Emeline et les deux Sébastiens. Merci particulièrement à Hervé pour le temps passé à faire et à refaire tant de beaux petits objets. A Seb merci d'avoir rigolé à tant de blagues (drôles) que je passais mon temps à confectionner.

Merci à Manu et Sajad pour leur constante motivation et leur boulot impeccable. Merci aussi aux téloméristes (Marie-Jo, Anaïs, Rémy, Simon, Sabrina). Bon courage pour la suite ici ou de l'autre côté de l'océan. Merci également, à Maggy, Hélène et Nora sans qui rien ne tournerait rond.

Ensuite, merci aux physiciens (Philippe, Julien, Guillaume, Lamia, Léonor, Samuel, Ed, Nicolas, Thibaud, Lotfi, Brice, Gaël, Yves-Henri, Cédric, Benji, Gilles, Eric et Christophe) pour leur bonne humeur.

Enfin merci à ma famille qui m'a toujours épaulé et soutenu et sans laquelle je ne serai certainement pas là aujourd'hui. Un message particulier au petit dernier qui, j'en suis sûr, fera un malheur dans tout ce qu'il entreprendra !



Early microscopes

Éléments de signalement de la thèse

A. Titre

a. Titre en français

Dynamique à l'équilibre et hors d'équilibre de la chromatine visualisée par microscopie de force atomique : effet des variants d'histones et des facteurs de remodelage

b. Titre en anglais

Equilibrium and out of equilibrium dynamics of chromatin visualized by atomic force microscopy : effect of histone variants and remodeling factors

B. Résumé

a. Résumé en français

L'organisation de l'ADN sous forme de nucléosome représente une barrière pour la liaison des facteurs de transcription à leur ADN-cible et interfère avec différents processus cellulaires. Les facteurs de remodelage et l'incorporation de variants d'histones dans la chromatine sont utilisés à l'intérieur de la cellule pour surmonter cette barrière nucléosomale et modulent l'accès à l'ADN au travers du contrôle de la dynamique nucléosomale. Dans ce travail nous utilisons une technique de molécule unique (la Microscopie à Force Atomique, AFM) pour visualiser des mono- et oligo- nucléosomes et quantifier leur structure et leur dynamique tant à l'équilibre que hors-équilibre.

Nous étudions tout d'abord l'impact de l'incorporation de H2A.Bbd au niveau du mono- et de l'oligo- nucleosome. Nous montrons que ce variant d'histone modifie à la fois la structure et la dynamique du nucléosome et que sa présence altère la faculté de la chromatine à former une structure d'ordre supérieur. En utilisant un modèle issu de la physique des polymères, nous expliquons quantitativement ce comportement par les propriétés dynamiques du nucléosome et plus précisément la flexibilité du mononucléosome.

Nous étudions ensuite le mécanisme du remodelage des nucléosomes par SWI/SNF et RSC. Pour ce faire nous déterminons simultanément la longueur d'ADN complexée et la position pour des mono-nucléosomes. Nous mettons en évidence un intermédiaire réactionnel sous la forme d'un nucléosome sur-complexé apparaissant avant le nucléosome glissé. Enfin, pour des di-nucléosomes, nous visualisons différents types d'états glissés que nous utilisons pour construire un modèle stochastique montrant que RSC est un randomiseur processif et séquentiel.

b. Résumé en anglais ("Summary")

The organization of DNA into nucleosome can be seen as a barrier for the transcription factors binding to their target DNA sequences and interferes with several basic cellular processes. ATP-remodeling machines and the incorporation of histone variants into chromatin are used by the cell to overcome the nucleosomal barrier and modulate DNA

accessibility by the control of nucleosome dynamics. In this work, we use a single molecule technique (Atomic Force Microscopy, AFM) to visualize isolated mono- and oligo-nucleosomes and quantify their structure and dynamics at equilibrium and out of equilibrium.

First, we study the impact of H2A.Bbd incorporation at the mononucleosome and oligonucleosome level. We show that this variant modifies both structure and dynamics of the complex and its presence alter the ability to form an higher structure organization of the chromatin. Using a polymer physics model we demonstrate that the behavior of variant chromatin can be quantitatively explained by the mononucleosome dynamical properties and more precisely by the nucleosome flexibility.

Then, we study the mechanism of nucleosome remodeling by SWI/SNF and RSC on mono- and di- nucleosomes. To do so we determine simultaneously the mononucleosome DNA complexed length and position distributions and produce 2D histograms in various contexts. We demonstrate the appearance of a reaction intermediate visible as an over-complexed nucleosome. Finally, focusing on the di-nucleosomes, we report different slided states that are used to construct a simple stochastic model showing that RSC is a highly processive and sequential randomizer.

C. Mots clés

a. Mots clés en français

Remodelage de la chromatine, variant d'histone, nucléosome, H2A.Bbd, SWI/SNF, RSC, AFM, analyse d'image, modélisation

b. Mots clés en anglais ("Keywords")

Chromatin remodeling, histone variant, nucleosome, H2A.Bbd, SWI/SNF, RSC, AFM, image analysis, modeling

D. Informations sur les laboratoires dans lesquelles la thèse a été préparée

a. Laboratoire de rattachement

Laboratoire Joliot Curie
École Normale Supérieure de Lyon
46 allée d'Italie
69364 Lyon cedex 07
FRANCE

Liste des abréviations principales

ADN : Acide désoxyribonucléique	L_c : Longueur d'ADN complexé dans le nucléosome
AFM : Microscopie à force atomique	M : Molaire
ARN : Acide ribonucléique	NAP1 : <i>Nucleosome Assembly Protein 1</i>
ARNm : ARN messager	NaCl : Chlorure de sodium
ARNpolIII : ARN polymérase II	NCP : particule de coeur du nucléosome
ATP : Adénosine-triphosphate	NFR : <i>Nucleosome free region</i>
BET : Bromure d'éthidium	NHR : Région non-histone
CenH3 : <i>Centromeric H3</i>	ORF : cadre de lecture ouvert
ChIP : immuno-précipitation de chromatine	pb : paire de bases
dNTP : désoxyribonucléotides	PCR : <i>Polymerization chain reaction</i>
Da : Dalton (1g /mol)	Q : facteur de qualité de l'oscillateur
DNMT : DNA méthyltransferase	R_c : Rayon de courbure finale de la pointe AFM
EDTA : Acide éthylène-diamide-tétra acétique	siRNA : <i>silencing interference RNA</i>
FACT : Facilitates chromatin transcription	SDS : Sodium dodécyl sulfate
FISH : <i>Fluorescence in situ hybridization</i>	UV : Ultraviolet
FRAP : <i>Fluorescence Recovery After Photobleaching</i>	WT : <i>Wild type</i> (sauvage)
GFP : <i>Green fluorescent protein</i>	Xa : chromosome X actif
HAT : Histones acétyltransférase	Xi : chromosome X inactif
HDAC : Histones déacétylase	ΔL : Distance du nucléosome au centre du fragment
HMT : Histone méthyltransferase	θ : angle d'ouverture du nucléosome
HP1 : <i>Heterochromatin protein 1</i>	ω : pulsation de l'excitation
k : constante de raideur du levier (N/m)	ω_0 : pulsation de résonance de l'oscillateur
k_B : constante de Boltzmann	Å : Angstrom (100 pm)
kT ou $k_B T$: Energie des fluctuations thermiques	
KO : <i>Knock out</i> (mutant nul)	

Quelques ordres de grandeurs utiles

$k_B T = 4 \text{ pN.nm}$
Hydrolyse de l'ATP : 12-21 $k_B T$
Une liaison hydrogène : 1-20 $k_B T$ et 0.25 nm
Une liaison covalente : 60-100 $k_B T$ et 0.1 nm
Diamètre de l'ADN = 2 nm
Pas de la double hélice d'ADN = 3.4 nm
Diamètre du nucléosome = 11 nm
Masse molaire du nucléosome = 200 kDa
Génome de la levure *Saccharomyces cerevisiae* : 12 Mpb
Génome de l'homme : 3 Gpb
Diamètre d'une cellule : 10-100 μm
Diamètre du noyau cellulaire : 10-20 μm
Rayon de courbure final d'une pointe AFM (DLCS) = 1-3 nm

Table des Matières

Introduction	11
1.1 DE L'ADN A LA CHROMATINE	11
1.1.1 L'ADN.....	11
1.1.2 Les Histones.....	13
1.1.3 Le Nucléosome.....	15
1.1.4 Le chapelet nucléosomal et la fibre de 30nm	18
1.1.5 Les territoires chromosomiques et les chromosomes mitotiques	19
1.2 MODIFICATIONS EPIGENETIQUES DE LA CHROMATINE	21
1.2.1 Modifications covalentes des histones.....	22
1.2.1.1 Les variants d'histones	23
1.2.1.2 Les variants de H3	25
1.2.1.3 Les variants de H2A	25
1.2.1.4 Conclusion sur les variants d'histones.....	32
1.2.2 Les facteurs de remodelage	32
1.2.2.1 Historique	32
1.2.2.2 Les différentes classes de remodeleurs.....	33
1.2.3 Conclusion sur les facteurs de remodelage	43
1.3 LES TECHNIQUES DE MOLECULES UNIQUES ET LEUR APPLICATION A L'ETUDE DES MOTEURS MOLECULAIRES	43
1.3.1 Les expériences de molécules uniques sur les moteurs moléculaires	43
1.3.1.1 Méthodes passives / suivi	45
1.3.1.2 Méthodes actives / application d'une force	47
1.3.1.3 Lien avec l'étude des facteurs de remodelage de la chromatine	51
1.3.2 La Modélisation des moteurs moléculaires	51
1.3.2.1 Modèles discrets	52
1.3.2.2 Modèles continus.....	52
1.3.2.3 Comparaison des deux types de modélisation.....	53
1.3.3 Etude mécanistiques des facteurs de remodelage de chromatine	54
1.3.3.1 Expériences biochimiques	54
1.3.3.2 Expériences en molécules uniques et études structurales.....	56
1.4 PROJET DE THESE	63
 Méthodes	 65
2.1 LA MICROSCOPIE A FORCE ATOMIQUE.....	65
2.1.1 Historique	65
2.1.2 Principe Général	67
2.1.2.1 Mode Contact	69
2.1.2.2 Mode Non-contact (Oscillant)	70
2.1.2.3 Mode Contact Intermittent – Tapping	72
2.1.2.4 Autres Modes.....	74
2.1.2.5 L'AFM et la spectroscopie de force	74
2.1.3 Artéfacts et limitations de l'AFM en imagerie	75
2.1.3.1 Dérive thermique et fluage piézo-électrique	75
2.1.3.2 Non-linéarité piézo-électrique et couplage X-Y-Z.....	76

2.1.3.3	Résolution en X,Y	77
2.1.3.4	Résolution en Z.....	78
2.2	ANALYSE D'IMAGES ET AFM.....	79
2.2.1	<i>Les outils morphologiques.....</i>	80
2.2.1.1	Les éléments structurants, l'image binaire	81
2.2.1.2	La translation	82
2.2.1.3	La dilatation	82
2.2.1.4	L'érosion	83
2.2.1.5	La fermeture et l'ouverture	83
2.2.1.6	La distance et dilatation géodésique.....	84
2.2.1.7	Le squelette, la transformation tout ou rien et l'amincissement	85
2.2.1.8	Segmentation et morphologie	87
2.2.1.9	L'AFM, une dilatation en nuance de gris	88
2.2.2	<i>Pré-traitements</i>	88
2.2.2.1	Aplatissements.....	88
2.2.2.2	Sur-échantillonnage	89
2.2.3	<i>Analyse des mono-nucléosomes.....</i>	89
2.2.3.1	Sélection des objets d'intérêts	91
2.2.3.2	Extraction des paramètres et résolution de la méthode	92
2.2.4	<i>Analyse des mono-nucléosomes marqués streptavidine.....</i>	94
2.2.4.1	Sélection des objets d'intérêts	94
2.2.4.2	Extraction des paramètres et résolution de la méthode	94
2.2.5	<i>Analyse des chromatines</i>	96
2.2.5.1	Sélection des objets d'intérêts	96
2.2.5.2	Extraction des paramètres.....	96
2.2.6	<i>Boite glissante.....</i>	98
2.3	SURFACES ET DEPOSITION DE BIOMOLECULES	101
2.3.1	<i>Ions multivalents.....</i>	102
2.3.2	<i>Polymères cationiques et spermidine</i>	104
2.3.3	<i>Silanes et mica silylés.....</i>	105
2.3.4	<i>Mono/Bi-couches lipidiques supportées.....</i>	107
2.4	CONDITIONS EXPERIMENTALES D'ACQUISITIONS DES IMAGES AFM.....	108

À l'équilibre : Les mono-nucléosomes 111

3.1	LES MONO-NUCLEOSOMES CONVENTIONNELS	111
3.1.1	<i>Premières cartes $L_c/\Delta L$ et autres paramètres.....</i>	111
3.1.2	<i>Etalonnage de la méthode d'analyse et des cartes $L_c/\Delta L$.....</i>	116
3.1.2.1	Effet de la flexibilité de l'angle d'entrée sortie	117
3.1.2.2	Effet de la longueur de persistance L_p	118
3.1.2.3	Effet de la corrélation $\theta/l_{1,2}$	118
3.1.2.4	Corrélation $\theta/l_{1,2}$ et désynchronisation des deux bras.	118
3.2	ENERGETIQUE DU NUCLEOSOME : MODELE LINEAIRE	121
3.2.1	<i>Présentation du modèle</i>	121
3.2.2	<i>Extraction des paramètres et interprétation.....</i>	123
3.3	QUELQUES FACTEURS A L'EQUILIBRE MODIFIANT LA CARTE $L_c/\Delta L$: HISTONE DE LIAISON, TETRASOME	125
3.3.1	<i>Tétrosomes $(H3-H4)_2$.....</i>	126

3.3.2	<i>Effet de l'histone de liaison H1</i>	129
3.4	MONO-NUCLEOSOMES VARIANTS H2A.BBD ET CHIMERES	130
3.4.1	<i>Visualisation de mono-nucléosomes H2A.Bbd et obtention de la distribution de longueur complexée</i>	130
3.4.2	<i>Modélisation de la distribution de longueur complexée</i>	132
3.4.3	<i>Mono-nucléosomes chimères Bbd.ddH2A</i>	132
3.5	CONCLUSION SUR LES MONO-NUCLEOSOMES A L'EQUILIBRE	133
A l'équilibre : Les oligo-nucléosomes		135
4.1	FIBRES NUCLEOSOMALES CONVENTIONNELLES	135
4.1.1	<i>Reconstitution et visualisation</i>	135
4.1.2	<i>Analyse quantitative de la conformation des fibres nucléosomales</i>	137
4.1.3	<i>Effet de l'histone de liaison H1</i>	138
4.2	FIBRES NUCLEOSOMALES VARIANTES H2A.BBD	139
4.2.1	<i>Visualisation des chromatines variantes</i>	139
4.2.2	<i>Comparaison avec les fibres conventionnelles</i>	140
4.3	MODELISATION : DU FACTEUR DE STRUCTURE A LA MECANIQUE DES FIBRES NUCLEOSOMALES	141
4.3.1	<i>Définition et calcul du facteur de structure</i>	141
4.3.2	<i>Un modèle dynamique simple pour les fibres de chromatine vues par AFM</i>	144
4.3.3	<i>Effet de la flexibilité du nucléosome : chimère H2A.ddBbd</i>	148
4.4	CONCLUSIONS SUR L'ETUDE DES CHAPELETS DE NUCLEOSOMES A L'EQUILIBRE	150
Hors-équilibre : Les mono-nucléosomes		153
5.1	MONO-NUCLEOSOMES NON MARQUES	153
5.1.1	<i>SWI/SNF et mono-nucléosomes courts positionnés</i>	153
5.1.1.1	<i>Principe de l'expérience et visualisation</i>	153
5.1.1.2	<i>Cartes $L_c/\Delta L$ du glissement par SWI/SNF</i>	155
5.1.1.3	<i>Discussion préliminaire</i>	157
5.1.2	<i>RSC et mono-nucléosomes positionnés</i>	158
5.1.2.1	<i>Les états du nucléosome observés au cours du remodelage par RSC</i>	158
5.1.2.2	<i>Cinétiques et titrations de la réaction de remodelage par RSC</i>	159
5.1.2.3	<i>Segmentation et quantification de la cinétique</i>	162
5.1.3	<i>SWI/SNF et domaine d'accrochage de H2A</i>	165
5.2	RSC ET MONO-NUCLEOSOMES MARQUES	166
5.2.1.1	<i>Protocole et visualisation des mono-nucléosomes marqués</i>	167
5.2.1.2	<i>Glisse des nucléosomes marqués par RSC</i>	169
5.2.1.3	<i>Repliement des cartes $L_c/\Delta L$ des mono-nucléosomes marqués</i>	171
5.3	MONO-NUCLEOSOMES ET RETOUR A L'EQUILIBRE	172
5.3.1	<i>Principe de l'expérience de diffusion thermique du nucléosome</i>	172
5.3.2	<i>Expérience de relaxation thermique et cartes $L_c/\Delta L$</i>	174
5.4	ESSAI DE CONSTRUCTION D'UN MODELE 2D COMMUN POUR LES PHENOMENES DE GLISSEMENT ET DE RELAXATION	175
5.5	CONCLUSION ET PERSPECTIVES SUR L'ETUDE DES MONO-NUCLEOSOMES HORS EQUILIBRE	178

Hors-équilibre : Les oligo-nucléosomes.....	179
6.1 RSC ET DI-NUCLEOSOMES POSITIONNES.....	179
6.1.1 <i>Visualisation du glissement de di-nucléosomes et regroupements.....</i>	179
6.1.2 <i>Titration, cinétique et évolutions des états.....</i>	181
6.1.3 <i>De la modélisation à la construction d'un schéma cinétique.....</i>	184
6.1.3.1 Construction d'une simulation numérique simple.....	184
6.1.3.2 Chaînes de Markov et ajustement des paramètres.....	194
6.1.3.3 Conclusion sur le glissement des di-nucléosomes.....	199
6.1.4 <i>Retour sur le glissement des mono-nucléosomes marqués.....</i>	199
6.2 RSC ET TRI-NUCLEOSOMES POSITIONNES	201
6.3 RSC ET OLIGOSOMES DE 9 REPETITIONS.....	204
 Conclusions et Perspectives	 206
 Bibliographie.....	 208

Avant-propos : De la génétique à l'épigénétique

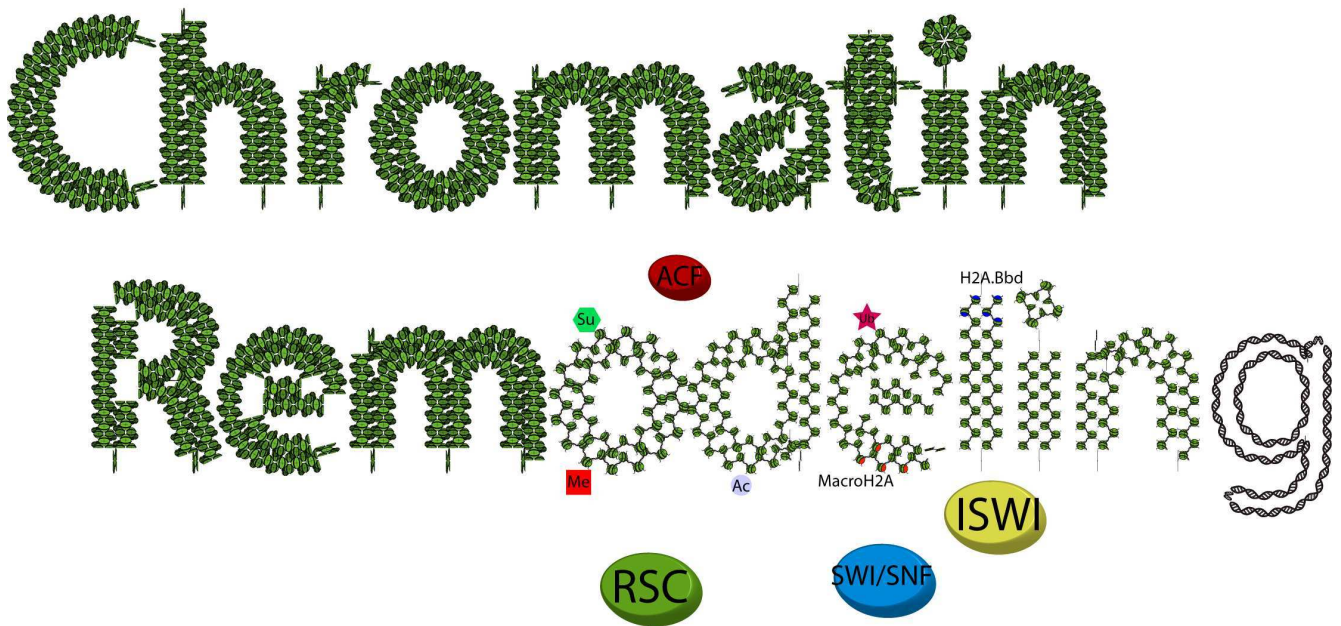
Les progrès de la génétique ont permis le séquençage du génome de nombreuses espèces et ont produit de très grandes quantités de données. Toute l'information nécessaire à la formation d'un individu étant comprise dans cette somme on pourrait s'attendre à ce que la connaissance de l'information génétique dans son ensemble soit suffisante pour décrypter le fonctionnement d'une cellule. Néanmoins, c'est oublier le fait que tous les éléments contenus dans notre ADN ne sont pas utilisés en même temps ou au hasard, mais qu'il existe une régulation très complexe, et dans certains cas, redondante de nos gènes. L'épigénétique, c'est à dire la compréhension de la manière suivant laquelle notre patrimoine génétique est transformé en phénotype visible, est donc un enjeu majeur. Si l'on comprend aujourd'hui clairement comment une zone prête à être transcrite est transformée en ARN puis en protéine il existe encore de nombreuses questions sur la formation des zones actives (l'euchromatine) ou inactives (l'hétérochromatine). Nous verrons qu'il a été montré que certaines modifications particulières de la chromatine sont présentes au niveau des zones actives alors que d'autres sont présentes au niveau des régions inactives. Plus précisément nous verrons que les variants d'histones ou les facteurs de remodelages sont capables de cibler certaines régions particulières et peuvent même influencer la configuration de la chromatine dans ces régions. Ces processus, qui sont étroitement liés à la différenciation cellulaire et au développement, représenteraient par conséquent des plates-formes pour contrôler l'activation ou l'inactivation de la chromatine.

L'objet de cette thèse est d'étudier au niveau des molécules isolées comment ces deux phénomènes sont capables de modifier la dynamique du nucléosome et plus généralement la conformation de la chromatine. Avant d'aborder les résultats, nous exposerons dans le chapitre 1 l'état des connaissances sur la structure et la dynamique de la chromatine puis l'effet des modifications épigénétiques de la chromatine en nous focalisant sur le rôle des variants d'histones et des facteurs de remodelage. Nous avons choisi de présenter ensuite les études de molécules uniques menées sur les moteurs moléculaires en général et sur les complexes de remodelage en particulier, afin de situer ce travail de thèse dans le contexte de ces approches. La méthodologie que nous avons développée est détaillée et analysée dans le Chapitre 2. Elle est basée sur la microscopie à force atomique et la fonctionnalisation du mica par des mono-couches de silanes, couplées à une analyse d'image automatisée.

Dans les chapitres 3 et 4 nous verrons, que cette approche permet de montrer que l'incorporation d'un variant d'histone tel que H2A.Bbd modifie profondément la physique des mono- et oligo-nucléosomes. Ces observations nous conduiront à proposer un modèle mettant en avant le rôle des fluctuations d'ouverture et de fermeture des nucléosomes dans la formation du degré d'organisation supérieure de la chromatine qu'est la fibre compacte de 30nm.

Au-delà de cette étude à l'équilibre, nous allons montrer dans le chapitre 5 que les facteurs de remodelage de la sous-famille de swi2/snf2 (SWI/SNF et RSC) sont, eux aussi, capables de modifier la dynamique du nucléosome en créant un état métastable particulier, sur-complexé et très labile. Les propriétés de cette particule nucléosomale remodelée

semblent indiquer qu'elle correspond à un compromis structurel entre le nucléosome canonique et le nucléosome glissé. Pour finir, nous étendrons cette étude à une échelle plus grande dans le chapitre 6 pour nous intéresser au glissement de di-nucléosomes par RSC. Nous démontrerons que ce facteur de remodelage se comporte comme un moteur moléculaire stochastique non directionnel, d'une grande processivité et glissant les nucléosomes d'une chromatine de manière séquentielle.



1

Introduction

1.1 De l'ADN à la chromatine

Avant de nous intéresser directement aux phénomènes que nous avons étudiés au cours de cette thèse, nous allons tout d'abord replacer ce travail dans un cadre plus général en rappelant ce qui est connu à l'heure actuelle au sujet de l'organisation de la chromatine. Cela nous permettra d'introduire les éléments et les termes évoqués dans ce qui suivra.

1.1.1 L'ADN

Du point de vue du biologiste, l'ADN ou acide désoxyribonucléique est le support de l'information génétique, c'est à dire des caractères héréditaires d'un individu à sa descendance ou génome. Du point de vue du physicien, l'ADN est plutôt un polymère semi-flexible hétérogène extrêmement long (plusieurs milliards de monomères par fibres dans certains cas).

Fondamental pour de nombreuses raisons, il a donc été étudié massivement par toutes sortes de techniques et son étude a profondément influencé tous les domaines des sciences de la vie (Venter *et coll.* 2001) mais aussi la physique des polymères (Yakushevich 2004) voire dans certains cas la supraconductivité (Kasumov *et coll.* 2001).

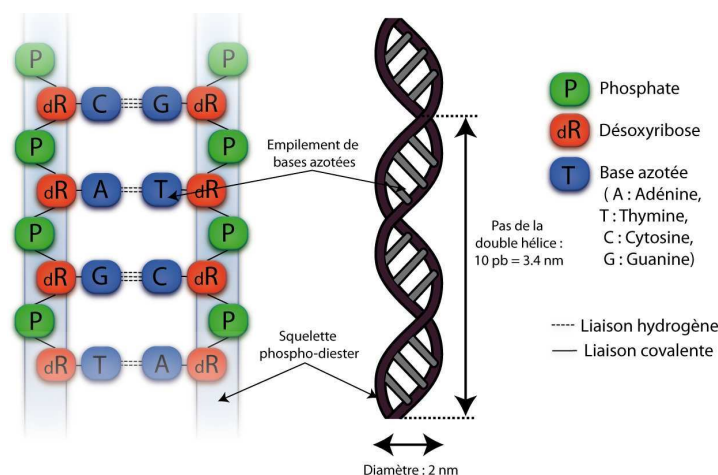


Figure 1 : Structure de l'acide désoxyribonucléique (ADN).

L'ADN est une double hélice de 2 nm de diamètre avec un pas est de 3.4 nm. Elle est composée de deux brins complémentaires solidaires du fait de liaisons hydrogènes entre bases complémentaires (A avec T, C avec G) susceptibles d'être séparées lors de certains processus cellulaires comme la réplication ou la transcription.

Sa structure cristallographique, élucidée par Watson et Crick (Watson *et coll.* 1953; Segal *et coll.* 2006), est celle d'une double hélice phospho-diester au centre de laquelle on trouve un empilement de couples de bases azotées ou paires de nucléotide (Figure 1). Les bases présentes sont de quatre types : l'adénine (A), la thymine (T), la cytosine (C) et la guanine (G). Fonctionnellement, on peut aussi voir cette double hélice comme deux molécules distinctes ou ADN simples brins associés spécifiquement par des interactions hydrogènes (A avec T par 2 liaisons H, G avec C par 3 liaisons H) .

Chacun de ces brins complémentaires comporte la même information génétique que son brin associé. Cette redondance permet entre autre chose une plus grande stabilité dans le temps de cette information, et facilite la duplication de cette information (ou réplication) à chaque cycle cellulaire. L'utilisation de cette information par la cellule est réalisée à travers une suite complexe d'étapes allant de la lecture de l'ADN (transcription) à la production de protéines codées par cette information (traduction). La modulation de l'accès à certaines parties du génome contrôle donc le contenu protéique et enzymatique de la cellule (Alberts 1983). Cette régulation est réalisée à partir de la fixation de certains facteurs particuliers (nommés facteurs de transcription) au niveau de chaque gène, unité de base du génome. Néanmoins, nous verrons aussi qu'une modulation épigénétique, c'est à dire qui ne dépend pas directement de la séquence ADN peut, dans certains cas, avoir lieu (Tsukiyama *et coll.* 1997).

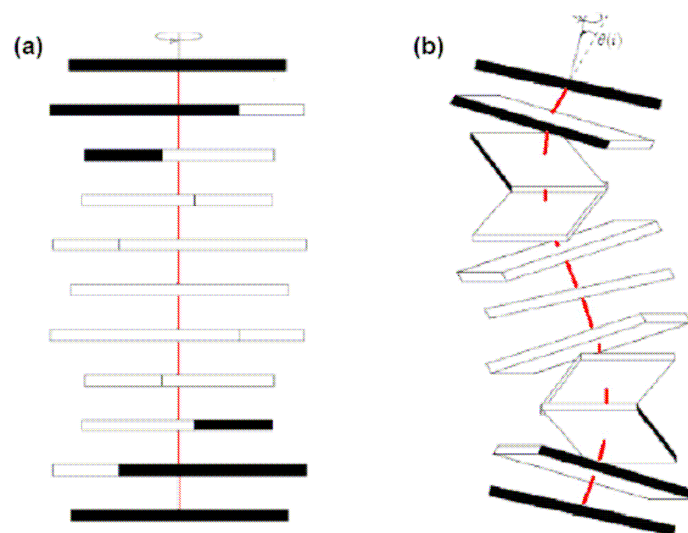


Figure 2 : Structure de l'ADN et désordre intrinsèque

(a) Vue idéale de la molécule d'ADN avec son axe principal rectiligne et son empilement de paires de bases formant une double hélice; (b) représentation plus réaliste incluant le désordre structurel induit par la séquence qui modifie l'axe principal de la molécule et sa dynamique. D'après (Calladine 2004)

L'axe principal de cette double hélice n'est pas comme on le croyait au départ une ligne droite. Il est perturbé par la séquence sous-jacente (Figure 2). Il a, en particulier, été montré que les séquences riches en GC ont tendance à courber plus fortement la molécule d'ADN (Mengeritsky *et coll.* 1983). La structure et la dynamique du double brin d'ADN est donc directement influencé par sa séquence. De la même manière certains facteurs de transcription sont connus pour se lier spécifiquement à certaines portions d'ADN et le courber (Rice *et coll.* 1996). Enfin, comme nous le verrons ensuite l'influence de la séquence ADN sur sa structure et sa dynamique explique notamment le phénomène de positionnement des nucléosomes.

1.1.2 Les Histones

A l'intérieur des cellules eucaryotes l'ADN est majoritairement présent sous la forme d'un complexe nucléo-protéique, le nucléosome. Les protéines formant cet assemblage ou histones sont de petites protéines basiques d'environ 13 kDa (100 à 130 acides aminés). Il existe 5 formes d'histones canoniques :

- H2A (14 kDa), H2B (14 kDa), H3 (15 kDa) et H4 (11 kDa) nommées histones de cœur
- H1 (21 kDa) nommée histone de liaison

Les histones de cœur possèdent une structure commune appelée "*histone fold*" (Malik *et coll.* 2003) représentée sur la Figure 3. Tous les eucaryotes possèdent des histones leur permettant d'organiser leur ADN. Les histones sont parmi les protéines les plus conservées au cours de l'évolution. Des études phylogénétiques montrent que des protéines possédant l'histone fold, ancêtres des histones appelées histones archéennes, sont apparues après la divergence entre les archaebactéries et les bactéries et avant la séparation des lignages archaebactérie / eucaryotes (Sandman *et coll.* 1998; Malik *et coll.* 2003).

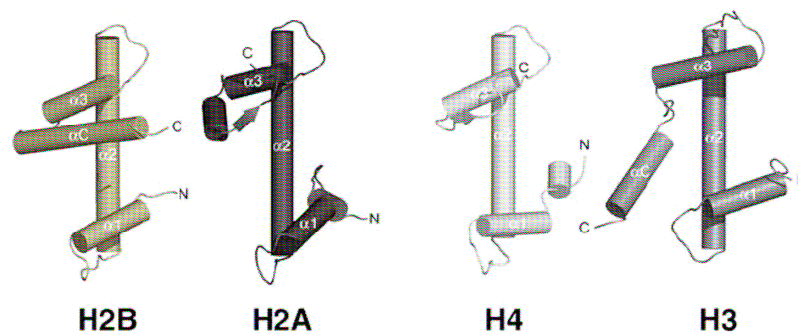


Figure 3 : L'histone fold

Les histones de cœur (H2A, H2B, H3 et H4) adoptent toutes la même structure secondaire appelée "*histone fold*", qui consiste en un enchaînement de trois hélices α représentées par les cylindres. L'*histone fold* est à la base de la dimérisation (H2A-H2B) et (H3-H4). Adapté de (Sondermann *et coll.*, 2003)

L'histone fold, composé de trois hélices α reliées entre elles par des boucles flexibles, constitue un motif de dimérisation, permettant aux histones d'interagir entre elles (H2A-H2B) et (H3-H4), via des interactions de nature hydrophobe. Ces interactions entre H2A et H2B ainsi qu'entre H3 et H4 sont appelées "poignée de mains" ("handshake") (Arents *et coll.* 1991).

En l'absence d'ADN et à une force saline modérée (150 mM NaCl), H3 et H4 s'associent entre eux et forment un tétramère (H3-H4)₂ alors que H2A et H2B restent associés sous forme de dimère (Figure 4). À forte force saline (2M NaCl), l'octamère d'histones se forme spontanément *in vitro* (Eickbush *et coll.* 1978).

De part et d'autre de l'histone fold, chaque histone possède des extrémités N-terminales et C-terminales. La structure des extrémités N-terminales, qui se localisent à l'extérieur du nucléosome, n'est pas connue. Les parties amino-terminales des histones ne participent pas significativement à la structure du nucléosome, elles semblent plutôt engagées dans des interactions impliquant d'autres protéines ou d'autres nucléosomes. Les queues des histones H2B et H4 en particulier sont importantes pour la formation de structure d'ordre supérieure de la chromatine. Ainsi, l'intégrité de la queue de H4 est nécessaire à la formation de la fibre de

30 nm (Dorigo *et coll.* 2003) ; la partie animo-terminale de H2B, quant à elle, est requise pour l'assemblage du chromosome mitotique (de la Barre *et coll.* 2000; de la Barre *et coll.* 2001).

Les queues des histones sont accessibles, et peuvent être modifiées chimiquement par des enzymes. Ces modifications post-transcriptionnelles jouent un rôle dans la structure de la chromatine, ou peuvent servir de motifs de reconnaissance à la liaison de facteurs régulateurs.

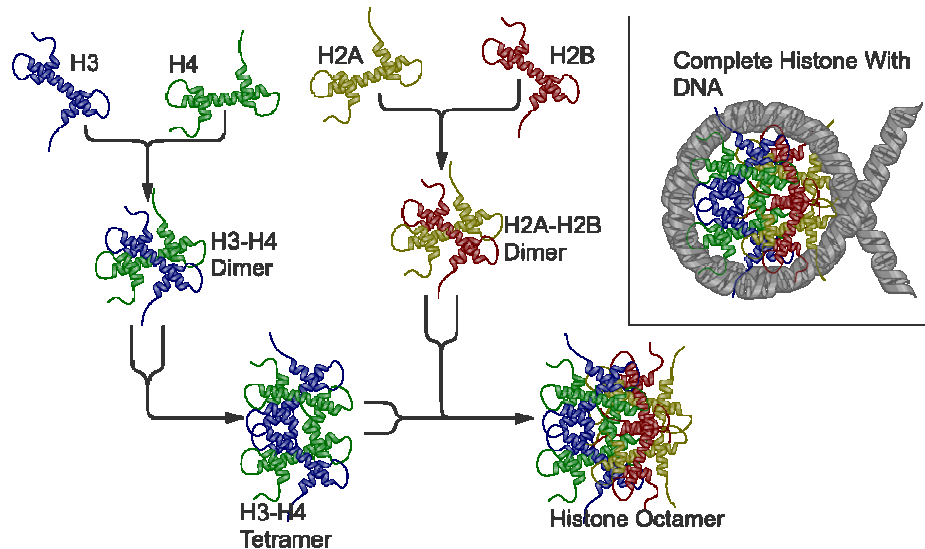


Figure 4 : La formation du nucléosome

Lorsque l'on met en présence les quatre histones de cœur celles-ci s'auto-organisent en un tétramère $(H3-H4)_2$ et deux dimères $(H2A-H2B)$. Pour une force ionique inférieure à 0.5 M et en présence d'ADN ces espèces s'assemblent pour former le nucléosome ou « nucleosomal core particle » (NCP). Adapté de Richard Wheeler.

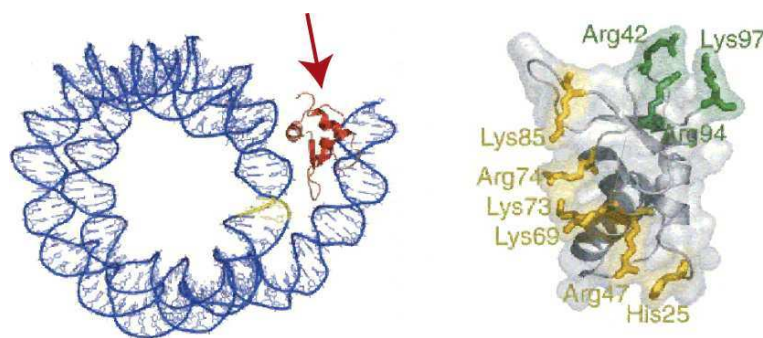


Figure 5 : L'histone de liaison

(à gauche) La partie globulaire de l'histone de liaison H5 (un histone proche de H1) (représentée en rouge) contacte l'ADN (en bleu) au niveau de la zone d'entrée-sortie du nucléosome. L'organisation des autres parties de cette histone de liaison n'est pas encore connue. (à droite) la structure de cette histone qui est très différente de celle des histones de cœur. Adapté de (Zhou *et coll.* 1998).

L'histone de liaison H1, représente l'autre famille d'histone. H1 n'a pas la même structure que les histones de cœur; celle-ci adopte une structure tripartite, constituée d'un domaine central globulaire flanqué des parties N- et C-terminales. Le domaine globulaire est conservé entre les variants de l'histone de liaison, tandis que les régions terminales divergent par leur taille et leur séquence (Wolffe *et coll.* 1997). Le domaine globulaire de H1 interagit avec les particules cœur des nucléosomes au niveau des brins d'ADN entrant et sortant (Figure 5). Il serait positionné asymétriquement, par rapport au centre de symétrie du nucléosome (Zhou *et coll.* 1998).

1.1.3 Le Nucléosome

On appelle 'particule de cœur du nucléosome' (NCP ou « *nucleosomal core particle* ») l'assemblage de 147 pb d'ADN et de 4 protéines ou histones présents en deux exemplaires. Dans 95 % des cas les histones présents sont H2A, H2B, H3 et H4. Structuellement, H2A et H2B sont associés sous forme de 2 dimères (H2A-H2B) alors que H3 et H4 sont présents sous forme d'un tétramère (H3-H4)₂. Les deux dimères (H2A-H2B) enserrent le tétramère (H3-H4)₂ dans une structure en sandwich autour de laquelle s'entoure deux tours et demi d'ADN formant une super-hélice gauche (voir Figure 6). Cette structure mesure 11 nm de diamètre et 6 nm de hauteur (Luger *et coll.* 1997). L'ADN interagit dans ce complexe avec les protéines histones en 14 points de contacts présents quasiment tous les 10 pb. Ces liens de type hydrogène – électrostatique confèrent au nucléosome une grande stabilité entre 20 et 30 kT selon les conditions ioniques, la température et la séquence (Richmond *et coll.* 2003). De manière générale cet assemblage est aussi nommé nucléosome lorsque l'on prend en compte les bras d'ADN de liaison qui sortent de part et d'autre du nucléosome. Cette structure à une symétrie axiale C₂ autour d'un axe appelé la dyade. Par généralisation, on nommera aussi dyade le point du fragment d'ADN correspondant placé au centre des 147 pb.

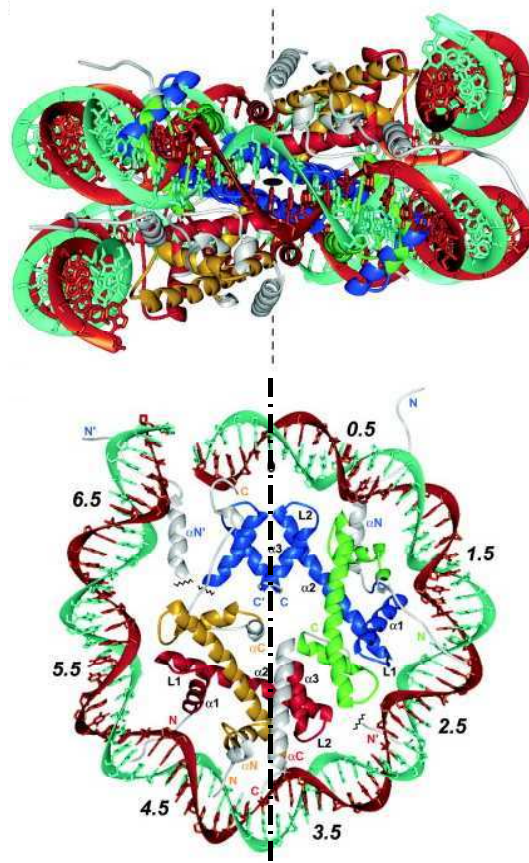


Figure 6 : Structure du nucléosome

La particule de cœur du nucléosome est un assemblage nucléo-protéique de 200 kDa. Il contient 1.75 tours d'ADN soit 147 pb entourant les quatre histones de cœur présents en doublés (H3, bleu; H4, vert; H2A, jaune; H2B, rouge). En première approche c'est un cylindre de 5.5 nm de rayon et de 6 nm d'épaisseur. (a) Vue de côté. Le trait pointillé représente l'axe de super-hélicité (b) Vue de dessus de la moitié supérieure. Les chiffres représentent l'énergie en k_BT par site pour chaque contact histone-ADN. Le trait pointillé noir représente l'axe dyadique. D'après (Richmond *et coll.* 2003).

Cette structure est très fortement conservée à travers tous les êtres vivants possédant un noyau ou eucaryotes. Elle est issue de différentes pressions sélectives antagonistes. La première est la nécessité de compacter l'ADN. En effet, la longueur de contour totale du contenu nucléique du noyau fait plusieurs mètres de long et son rayon de giration dans les conditions ioniques présentes serait de l'ordre de la dizaine de micromètre. A l'opposé la cellule doit pouvoir accéder en permanence au contenu génétique de certaines parties de son génome en vue de produire certains ARN (transcription) ou de dupliquer son contenu (réplication). Ces deux nécessités vitales pour la cellule ont abouti à une structure à la fois compacte et stable mais rapidement modifiable et très dynamique.

Pour donner un exemple de cette ambivalence on peut s'intéresser à la mobilité des nucléosomes par rapport leur séquences. En effet, bien que le mécanisme microscopique soit encore mal connu il apparaît que, pour certaines séquences, le nucléosome diffuse (Beard 1978; Meersseman *et coll.* 1992; Flauss *et coll.* 2004) sous l'effet d'une élévation de température (à partir 37°C par exemple). A l'opposé, pour des températures de l'ordre de 4°C aucun coefficient de diffusion ne peut être mesuré. Ceci montre que même si la structure du nucléosome est très stable une modification subtile de son organisation ou un apport faible en énergie peut conduire à une modification importante de sa dynamique.

Un second exemple correspond à la réponse en tension du nucléosome. Schiessel *et coll.* (Kulic *et coll.* ; Schiessel 2006) ont montré théoriquement que l'application d'une force de traction sur chacun des bras du nucléosome conduit à un abaissement significatif de la hauteur de la barrière énergétique séparant la forme « enroulée » de la forme « déroulée ».

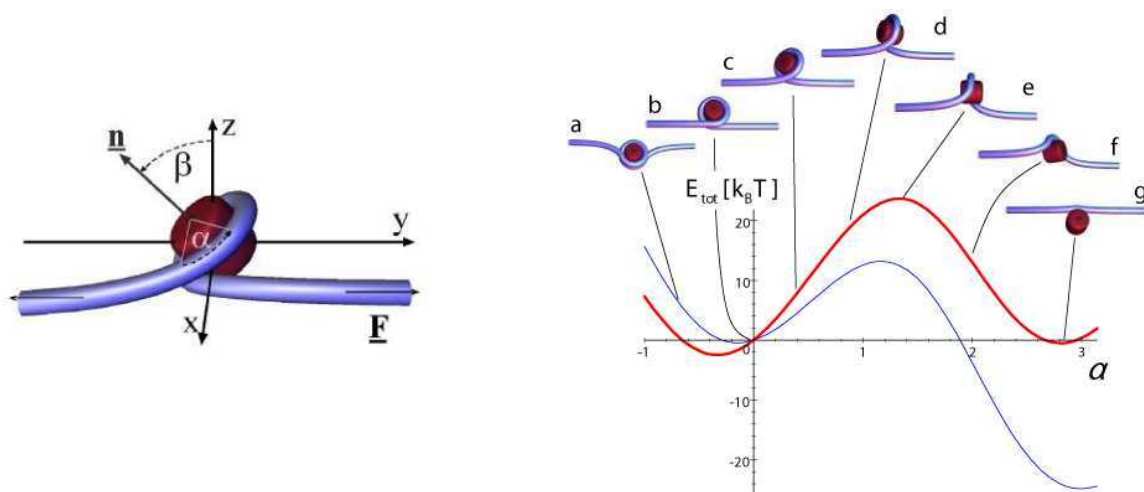


Figure 7 : Modélisation de l'application d'une force de tension sur un nucléosome

Le paysage énergétique du nucléosome (en rouge) est modifié sous l'effet d'une force de tension (en bleu). Ceci implique un abaissement de la barrière énergétique séparant la configuration enroulée (a) de la configuration déroulée (g). D'après (Schiessel 2006)

De la même manière, comme nous allons le voir dans ce qui suit un changement de composition en histone ou la rupture de quelques liens seulement entre l'ADN et les histones qui affectent très peu la stabilité globale du nucléosome modifie drastiquement sa dynamique. Plus généralement, on peut dire que tout se passe comme si les modifications citées ici modifiaient peu la position du minimum d'énergie du système mais abaissaient la hauteur des barrières séparant ce dernier des minima annexes. Ceci permet alors au système d'explorer transitoirement d'autres configurations et augmente sa dynamique. Pour revue sur la modélisation de la dynamique du nucléosome on pourra se reporter à (Schiessel 2006).

ENCART : Les Séquences Positionnantes

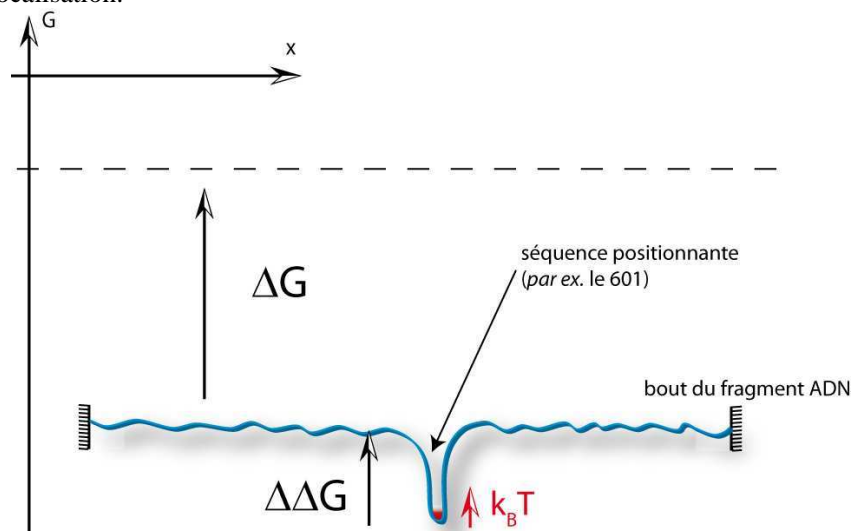
Il est connu depuis les années 1970 que les nucléosomes forment, dans la vaste majorité des cas, un arrangement régulier visible en microscopie électronique ou par digestion à l'aide de nucléases. Le maintien de cet espacement constant entre deux nucléosomes consécutifs est associé aux histones de liaison.

Le fait qu'une séquence particulière d'ADN puisse avoir un effet de positionnement sur le complexe nucléosomal fut proposé plus tard, avec les études Trifonov *et coll.* (Mengeritsky *et coll.* 1983) sur la composition nucléotidique de l'ADN nucléosomal et c'est à partir de la fin des années 90 que les premières séquences positionnantes complètement synthétiques ont pu être produites (Lowary *et coll.* 1997; Widlund *et coll.* 1997). Le but initial de ces travaux était de produire facilement une chromatine pour laquelle la position des nucléosomes serait contrôlée en vue de tester l'effet de la présence d'un nucléosome sur la transcription, la réplication, etc... De nos jours, la séquence synthétique la plus couramment utilisée est la séquence 601 de Widom *et coll.* (Lowary *et coll.* 1998; Thastrom *et coll.* 1999) conçue par sélections successives sur un ensemble de séquences aléatoires. La méthode de sélection utilisée dénommée SELEX est une méthode itérative qui permet de sélectionner à chaque passage les 10% de séquences dont l'affinité pour le nucléosome est la plus forte. Dans notre cas, nous avons utilisé cette séquence 601 (la plus forte affinité) pour toutes les études qui suivent ce qui nous a permis de connaître, à l'avance et avec une grande précision, la position de départ de nos nucléosomes.

Néanmoins il faut noter que si l'on place n'importe quelle séquence en présence de son équivalent en histone, on obtient après reconstitution des nucléosomes stables ($\Delta G \sim 20\text{-}30 \text{ kT}$ selon la séquence). La stabilité d'un nucléosome sur de telles séquences est donc une donnée relative.

En outre, l'origine microscopique de l'affinité plus importante ($\Delta\Delta G = 4 \text{ kcal/mol}$) d'une séquence par rapport à une autre a largement été discutée depuis ces dernières années. Il apparaît aujourd'hui que la présence de motifs particuliers riches en G/C (alternés avec des motifs riches en A/T dans certains cas) est à l'origine de l'énergie d'interaction supérieure de ces séquences (Segal *et coll.* 2006).

Des expériences sur des génomes entiers ont permis enfin de montrer *in vivo* la présence de tels effets de positionnement (Yuan *et coll.* 2005; Segal *et coll.* 2006). Néanmoins, d'autres phénomènes tels que la liaison de facteurs de transcription et l'action des facteurs de remodelage sont eux aussi capables de modifier cette localisation.



Profil énergétique d'une séquence positionnante

L'énergie libre de formation d'un nucléosome ΔG ($\sim 20\text{-}30 \text{ kT}$) dépend de la séquence. On peut donc construire un profil énergétique pour chaque position du nucléosome. Une séquence positionnante correspond à un puits de potentiel $\Delta\Delta G$ de plusieurs kT ($\sim 4 \text{ kT}$ pour la séquence 601 que nous utiliserons).

1.1.4 Le chapelet nucléosomal et la fibre de 30nm

La répétition de nucléosomes espacés régulièrement ou non conduit à la formation d'un chapelet de nucléosomes appelé communément fibre de 11 nm. Cette fibre de chromatine est à son tour compactée pour former des niveaux d'organisation supérieurs.

Entre la structure finale de la chromatine dans le chromosome mitotique et le chapelet nucléosomal, il a été postulé un certain nombre de niveaux intermédiaires d'organisation. Le premier niveau est nommé la fibre de chromatine de 30 nm. En effet, les premières études sur la chromatine qui étaient réalisées par microscopie électronique et digestion à la nucléase ont montré la présence d'une fibre régulière et compacte qui se forme en présence de l'histone de liaison H1 ou H5 et de l'interaction de H2A avec la partie N-terminale de l'histone H4. La généralité et l'organisation interne de ce type de fibre est depuis largement sujet à débat et plusieurs modèles contradictoires ont été proposés (Figure 8) (pour une revue des nombreux travaux on se référera à (Cook 1995; Gilbert *et coll.* 2005; Zhou *et coll.* 2007)).

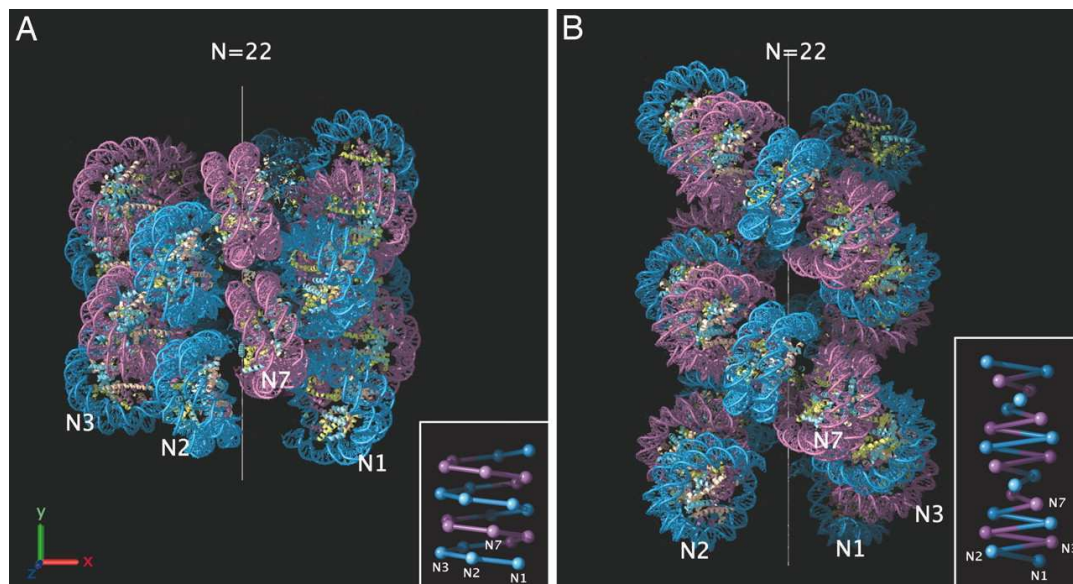


Figure 8 : Les modèles de fibre de 30 nm

(A) Modèle de solénoïde. (B) Modèle en zigzag. Adapté de (Robinson *et coll.* 2006).

Il a été montré récemment que l'organisation interne de cette fibre dépend de nombreux paramètres comme la concentration en ions divalents ou l'espacement entre nucléosomes consécutifs. Le diamètre de 30 nm précédemment observé passe par exemple de 30 à 40 nm lorsque l'on change l'espace entre nucléosome de 50 à 70 bp (Robinson *et coll.*, 2006) ce qui tendrait à montrer que l'organisation des nucléosomes les uns par rapport aux autres au sein de la fibre est une donnée flexible qui se modifie en fonction des conditions particulières comme la présence de facteur de transcription ou la régularité du positionnement des nucléosomes. Selon Schiessel *et coll.* la quantité conservée par la fibre dans toutes ces conditions serait la compaction des NCPs entre eux pour former une structure où les nucléosomes sont denses en surface (Depken *et coll.* 2007). Cette organisation compacte correspond probablement à des zones non actives de la chromatines qui ne sont pas transcrites par la cellule (Dubochet *et coll.* 1988; Woodcock 1994; Gilbert *et coll.* 2001) et qui par conséquent comportent l'histone de liaison. Dans les zones actives et/ou denses en gènes et/ou comportant des nucléosomes moins régulièrement organisés la chromatine serait présente

dans une conformation du type fibre de 11 nm (McDowall *et coll.* 1986; Horowitz *et coll.* 1994; Gilbert *et coll.* 2005) ce qui restreint la généralité du concept de fibre de 30 nm.

1.1.5 Les territoires chromosomiques et les chromosomes mitotiques

En ce qui concerne les degrés d'organisation supérieure, il a été longtemps postulé l'existence de fibres liées au sur-enroulement de la fibre de 30 nm sur elle-même. Cette hypothèse appelée *modèle chromonème* était basée sur la visualisation de fibre épaisse en microscopie électronique (Belmont *et coll.* 1994). Néanmoins le manque de preuve expérimentale claire ne permet pas actuellement de trancher définitivement sur leur existence.

En outre, différentes observations expérimentales tendent à démontrer la présence de boucles (de 200 à 300 nm de diamètre soit plusieurs centaines de kpb) ou *chromomères* (Cook *et coll.* 1975; Old *et coll.* 1977; McGregor *et coll.* 1988; Fraser *et coll.* 2007). Un modèle fonctionnel proposé par Cook *et coll.* (1995) propose, comme ce qui a été observé pour le nucléole, que chacune de ces boucles pourrait constituer une unité de transcription liée à un complexe de transcription (dont l'ARN polymérase). La liaison de ces complexes entre eux lors de la mitose produirait la structure protéique observée en métaphase. Néanmoins même si des foci de transcription ont pu être observés (Jackson *et coll.* 1993; Wansink *et coll.* 1993) et même si leur structure perdure après l'arrêt de la transcription (Mitchell *et coll.* 2008) la compréhension microscopique et dynamique de ces unités restent incertaine.

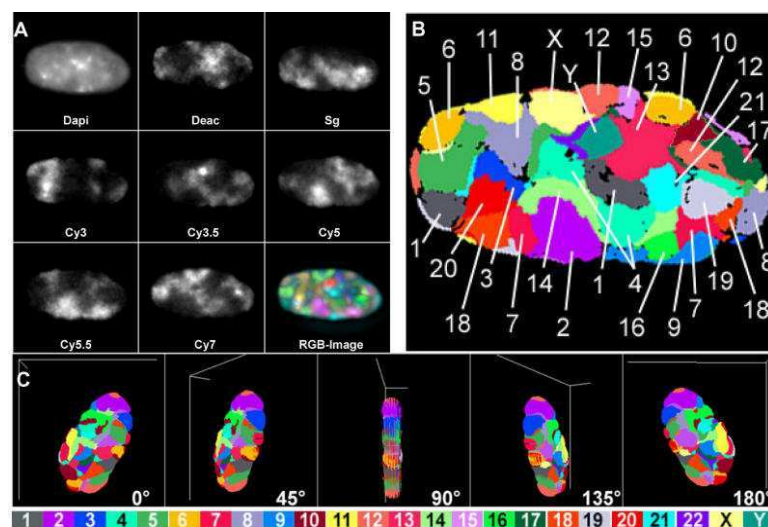


Figure 9 : L'organisation du noyau en territoires chromosomiques.

Lors de l'interphase les différents chromosomes sont confinés dans des zones distinctes appelés territoires chromosomiques séparés par des régions moins denses appelés espaces interstitiels. D'après (Bolzer *et coll.* 2005).

A un niveau encore supérieur, pendant l'interphase, les différents chromosomes du noyau sont localisés dans ce que l'on appelle les territoires chromosomiques comme le montre différentes études. Chacun de ces territoires contient un chromosome particulier (Figure 9). L'hypothèse proposée par Cremer *et coll.* est que la périphérie de chacun de ces domaines constituerait la partie active du chromosome (Cremer *et coll.* 2000; Cremer *et coll.* 2001; Cremer *et coll.* 2006; Cremer *et coll.* 2006; Lanctot *et coll.* 2007; Mateos-Langerak *et coll.* 2007) et que les espaces interstitiels reliés aux pores nucléaires seraient le moyen pour les

différentes macromolécules nucléaires d'accéder à la chromatine active (Figure 10). En outre, il a été montré récemment que la position même de ces territoires dans le noyau influe sur son activité transcriptionnelle (Finlan *et coll.* 2008). Une partie de chromosome qui devient active serait donc décondensée et déplacée en périphérie du territoire chromosomique (Lanctot *et coll.* 2007).

Lors de la mitose, la chromatine est présente hors du noyau sous une forme très compacte. Il apparaîtrait que dans cette structure la chromatine serait organisé en liaison avec un échafaudage protéique à l'intérieur du chromosome (Houchmandzadeh *et coll.* 1999; Marko 2008). Dans cette architecture complexe, il a été postulé que ce sont les boucles précédemment cités qui seraient elle-même encrés à leur pied à cette axe protéique ou échafaudage. Néanmoins des études tendent à remettre en cause le rôle des protéines et complexes protéiques présent dans cette architecture (comme la condensine I et II ou la topoisomérase II) (Hirano *et coll.* 1993). Il apparaît, par exemple, que la topoisomérase II n'est ni essentielle à la condensation du chromosome ni suffisante pour le maintien de cette compaction. Les facteurs donnant lieu à la condensation très forte du chromosome mitotique ou ceux induisant la forme de cette structure restent donc à déterminer (Belmont 2006; Marko 2008).

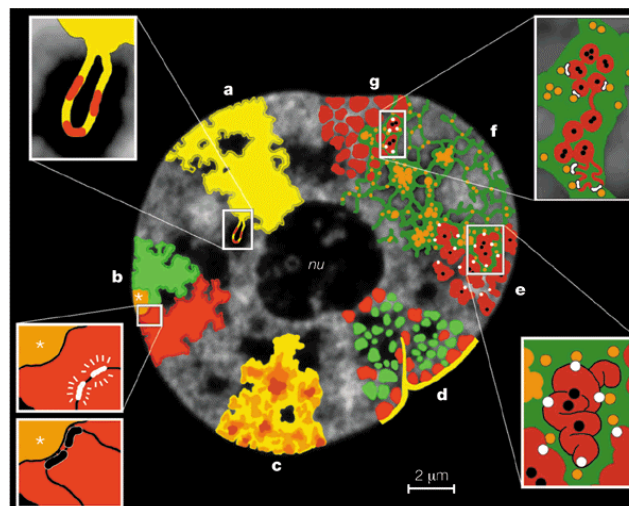


Figure 10 : Modèle d'organisation de la chromatine interphasique

Dans le modèle de Cremer *et coll.* (Cremer *et coll.* 2001). La chromatine est structurée en régions compactes susceptibles de s'ouvrir et de se déplacer (zoom (b)) vers des régions moins denses (zoom (a)) où se déroulerait la plus part des processus cellulaires.

L'organisation de la chromatine est donc à la fois dynamique et multi-échelle et de nombreuses questions restent en suspens. En particulier, si la structure du nucléosome ou de la fibre de 30 nm sont aujourd'hui des données connues (ou proche de l'être) leur dynamique est quant à elle très mal connue. En effet, il est aujourd'hui techniquement difficile de capter la réorganisation de structures nucléo-protéiques aussi complexes avec des résolutions spatiales et temporelles suffisantes. Néanmoins de nombreuses études sont actuellement menées en particulier *in vitro* pour atteindre cet objectif en 3C et 4C, FRET par exemple (Fraser *et coll.* 2007).

Pour résumer, on peut faire le schéma suivant (Figure 11) qui présente les éléments essentiels de cette organisation. Dans ce qui suit nous allons voir quelques phénomènes susceptibles de modifier cette organisation en modulant l'accessibilité à la séquence ADN.

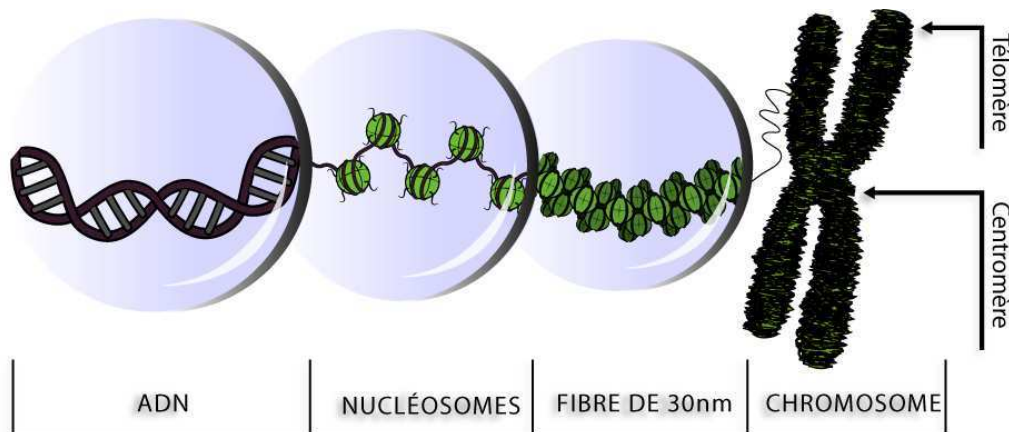


Figure 11 : Représentation simplifiée des différents niveaux d'organisation de la chromatine.

D'après (Boulard 2007).

1.2 Modifications épigénétiques de la chromatine

Une définition large de l'épigénétique est "l'interaction des gènes avec leurs produits donnant naissance au phénotype" (Waddington, 1942). En suivant ce point de vue, l'épigénétique est donc l'ensemble des processus qui modifie l'expression du génotype pour donner le phénotype observé. Pour ce qui nous intéresse, il est clair que l'expression de la séquence ADN risque d'être fortement modifiée par la structure et la dynamique de la chromatine qui la contient.

En particulier, on peut voir le nucléosome comme un obstacle physique pour de nombreux processus biologiques impliquant la liaison de protéines à l'ADN. Ainsi, le masquage d'un promoteur par le nucléosome inhibe la liaison des certains facteurs de transcription induisant une inhibition de la transcription (Lorch *et coll.* 1987; Izban *et coll.* 1991). Néanmoins, on peut faire remarquer que cette répression importante n'est pas vraiment totale même pour les zones fortement condensées de la chromatine (Folco *et coll.* 2008).

Trois processus principaux existent chez tous les eucaryotes et permettent entre autres choses de lever cette inhibition : les modifications covalentes des histones, l'incorporation de variants d'histones et le recrutement de facteurs de remodelage de la chromatine (Figure 12).

Chacune de ces voies est utilisée par la cellule dans différentes conditions et pas seulement dans ce but (ciblage de certains facteurs, déposition de la chromatine, formation du kinetochore). Néanmoins, elles sont aussi utilisées pour surpasser la barrière nucléosomale de différentes manières. La modification post-traductionnelle des queues d'histones et la présence de variants d'histones influencent la structure et la dynamique de la chromatine aux temps longs alors que les enzymes de remodelage de la chromatine permettent une action ponctuelle et dynamique aux temps courts.

Nous allons nous intéresser à chacune de ces stratégies visant à moduler l'accessibilité à l'ADN nucléosomal en nous focalisant sur certains points utiles dans la suite de ce travail.

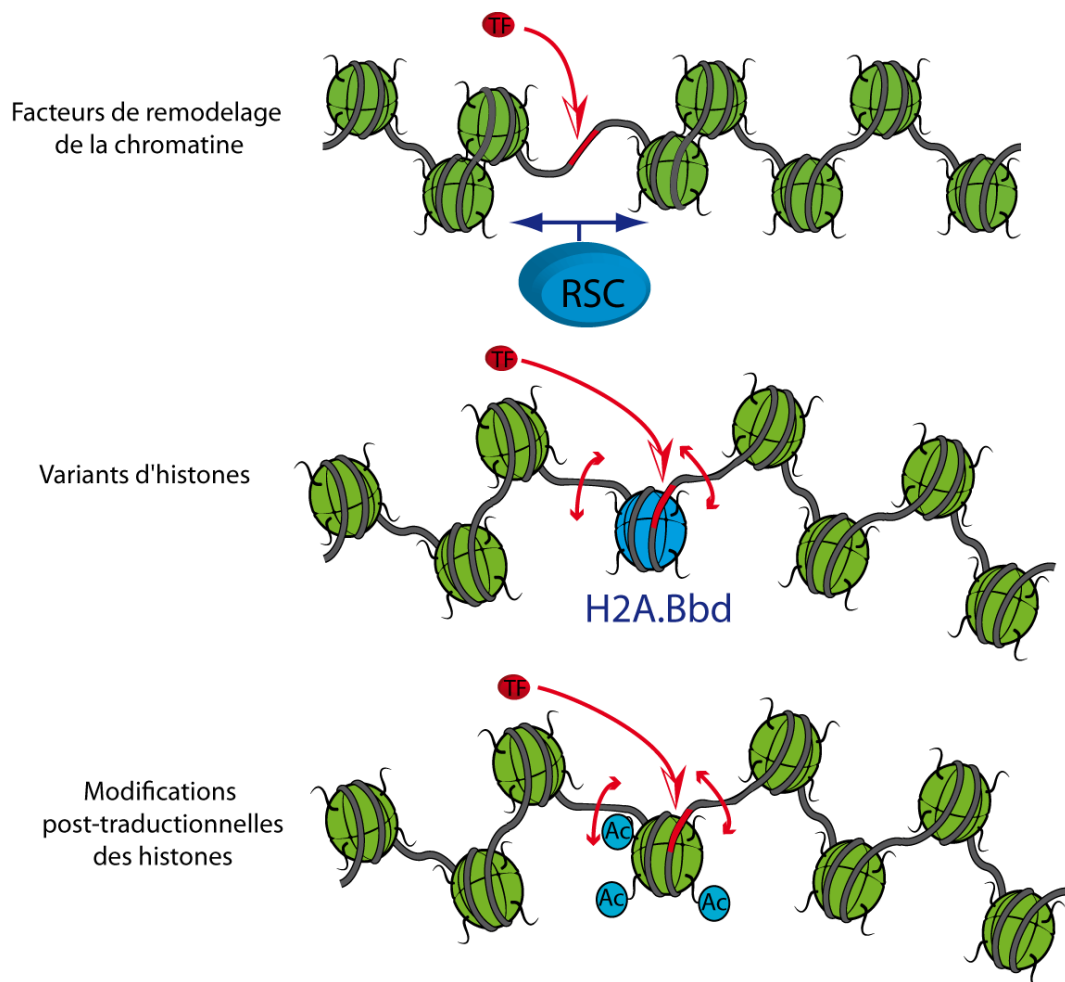


Figure 12 : Trois voies épigénétiques modulant l'accès à l'ADN

La conformation de la fibre de chromatine peut influencer l'accès à l'ADN par les facteurs de transcription (TF) et donc par exemple l'expression des gènes. Les trois voies principales de cette modulation sont les facteurs de remodelage de la chromatine comme RSC que modifient ou déplacent localement les nucléosomes, les variants d'histones comme H2A.Bbd et les modifications d'histones comme l'acétylation des queues d'histones qui modifient structurellement et dynamiquement la chromatine.

1.2.1 Modifications covalentes des histones

Les histones de cœur font l'objet d'un grand nombre de modifications post-traductionnelles. Parmi celles-ci on compte l'acétylation, la méthylation, l'ubiquitination, la sumoylation et la biotinylation des lysines, la méthylation des arginines, la phosphorylation des sérines et thréonines, mais aussi l'ADP ribosylation des acides glutamiques (pour revue (Kouzarides 2007)).

Les quatre histones canoniques sont modifiées post-traductionnellement, ainsi que certains variants (H3.3, H2A.Z, macroH2A) (Bonenfant *et coll.* 2006). Toutes les modifications d'histones sont réversibles. L'état de modification d'un résidu d'histone est contrôlé par un équilibre entre les enzymes qui catalysent l'ajout et celles qui catalysent le retrait d'un groupement donné.

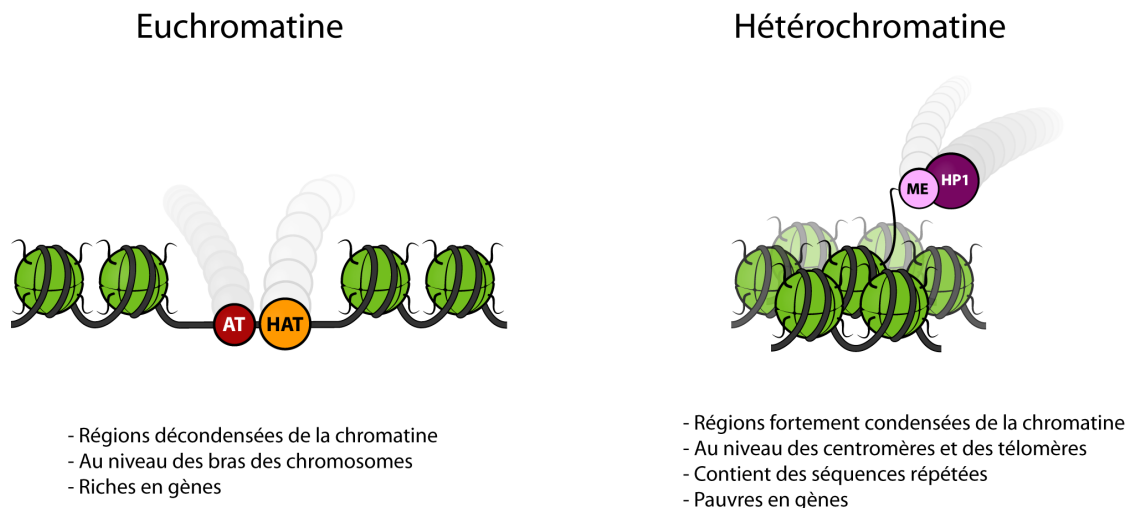


Figure 13 : Propriétés des régions euchromatiques et hétérochromatiques

L'euchromatine décondensée et riche en gènes est permissive à la transcription, par opposition à l'hétérochromatine, fortement condensée et pauvre en gène réfractaire à la transcription. Adapté de (Grewal *et coll.* 2007)

Les modifications post-traductionnelles des histones sont classées en deux catégories selon qu'elles sont corrélées avec une activation de la transcription ou une répression (Figure 13):

- Les modifications associées à une transcription active, telles que l'acétylation des histones H3 et H4, ou la di- ou tri-méthylation de H3K4 sont considérées comme des marques de l'euchromatine.
- Les modifications fréquemment observées sur les gènes réprimés, comme H3K9me3 ou H3K27me3, sont référencées comme des signatures de l'hétérochromatine.

Certaines modifications d'histones participent à la régulation de l'expression des gènes, soit en induisant directement une modification de la structure de la chromatine, soit en servant de plate-forme de liaison permettant le recrutement d'autres facteurs. Ainsi, les bromo-domaines sont capables de reconnaître une lysine acétylée, et les chromo-domaines une lysine méthylée.

Enfin, il existe pour chaque nucléosome de nombreux sites et types de modifications. Par conséquent de nombreuses possibilités de combinaisons entre celles-ci sont possibles (par exemple mono-, di- ou tri-méthylation H3K4). Il a donc été postulé l'existence d'un code « superposé » au code ADN qui déterminerait au niveau du nucléosome l'état de la région considéré. Etant modifiable, ce niveau d'information pourrait évoluer au cours du développement et en particulier au cours de la différenciation cellulaire. Résumé sous le nom de « code histone » cette hypothèse est encore largement discutée actuellement. Pour revue on se reportera au travail de (Ruthenburg *et coll.* 2007).

1.2.1.1 Les variants d'histones

Nous allons maintenant développer de manière plus importante une autre stratégie sélectionnée pour modifier l'accès à l'ADN chromatinien : les variants d'histones. Cela nous

permettra en particulier de décrire ce qu'il est connu actuellement sur les variants de H2A que nous avons étudié au cours de cette thèse.

On appelle histone conventionnelle l'histone déposée lors de la réplication de la chromatine (H2A par exemple). Les variants d'histones sont des isoformes non-alléliques des histones conventionnelles autrement dit, ce sont des protéines dont la séquence peptidique est proche de celle d'une histone et dont le gène correspondant est situé à une position (ou locus) différente du génome.

Ils ont la capacité d'être substitués aux histones canoniques au sein du nucléosome. Le pourcentage d'identité de chaque histone variant à sa contrepartie conventionnelle est très variable selon les cas (de 48 à 99.9 %). Certains sont très conservés et présents dans tout le règne animal comme H2A.Z alors que certains ne sont présents que chez les mammifères comme H2A.Bbd.

La présence des variants d'histones au sein du nucléosome a un impact important sur plusieurs processus cellulaires impliquant l'ADN, incluant la transcription, la réparation de l'ADN endommagé, la division cellulaire et la méiose ; et pourrait avoir d'importantes conséquences épigénétiques. Dans certains cas, comme nous le verrons, il a été montré que leur incorporation modifie la structure et la dynamique des nucléosomes. Des variants ont été rapportés pour chaque type d'histone à l'exception de l'histone H4 (voir Figure 14).

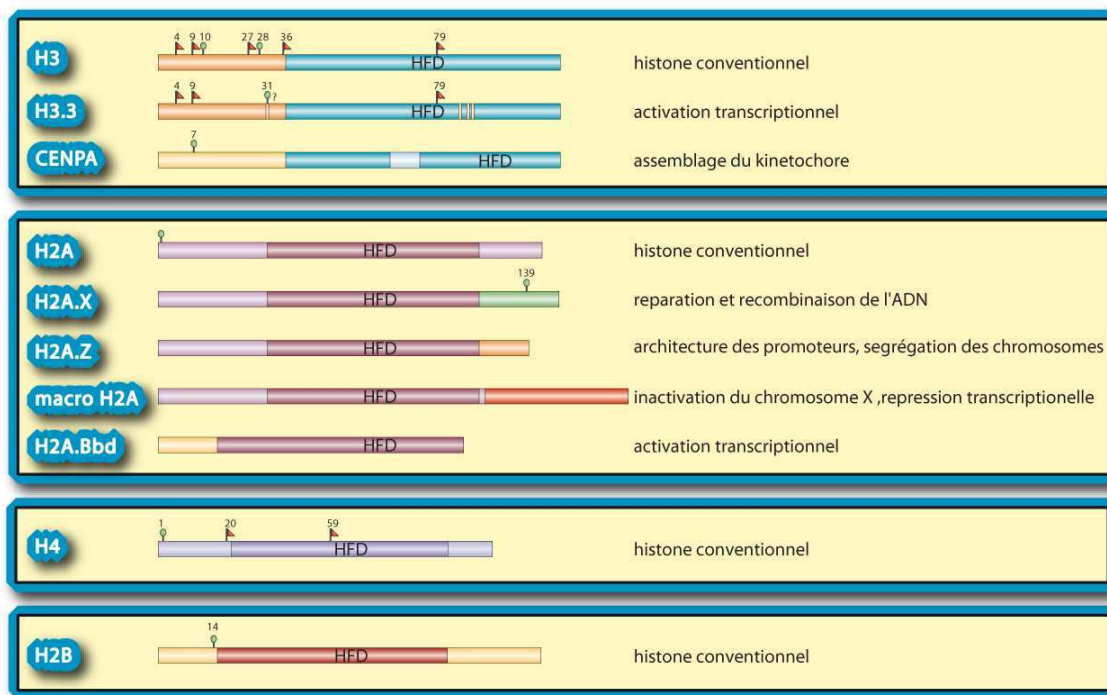


Figure 14 : Alignement des séquences des différents variants d'histones

HFD correspond à l'« histone fold ». Les marqueurs sont les zones de modifications post-traductionnelles. Adapté de (Sarma *et coll.* 2005).

Contrairement à leurs contreparties conventionnelles, leur messenger est dépourvu de la structure en tige boucle sur sa partie 3', qui est requise pour la dégradation régulée par le cycle cellulaire (Pandey *et coll.* 1987). À la place de cette tige boucle, les transcrits codant les variants sont poly-adenylés, ce qui augmente leur stabilité (Challoner *et coll.* 1989). Ces spécificités impliquent que les variants d'histones sont incorporés dans le nucléosome par différentes voies et sont pris en charge par des protéines chaperonnes spécifiques.

Bon nombre, de variants d'histone sont connus pour être liés à la spermatogénèse qui nécessite un profond remodelage de la chromatine. Néanmoins, nous allons dans ce qui suit présenter les propriétés marquantes des histones variants en nous restreignant aux histones ubiquitaires (c'est à dire présent dans tous les types cellulaires) et en mettant l'accent sur les variants de l'histone H2A.

1.2.1.2 Les variants de H3

Cinq isoformes distinctes d'H3 sont présentes chez les mammifères, H3.1, H3.2, H3.3, H3t et CENP-A . Les différences observées entre les variants d'H3 semblent mineures, mais une sélection positive très forte pèse sur chaque histone (Marzluff *et coll.* 2002). Chaque différence, même minime, semble donc être liée à une conséquence fonctionnelle importante.

Les variants d'H3 spécifiques des centromères (cenH3) sont un des piliers de la construction des centromères, car indispensables à la formation des kinétochores, eux-mêmes responsables de l'attachement des microtubules et de la ségrégation chromosomique lors de la mitose et de la méiose (Blower *et coll.* 2001). En outre, les centromères ne sont pas définis par une séquence d'ADN spécifique mais par la présence des cenH3, ce qui a servi historiquement à leur cartographie chez les plantes et les animaux (Henikoff *et coll.* 2005; Henikoff *et coll.* 2005). L'incorporation des cenH3 se produirait de manière indépendante de la réplication (Amor *et coll.* 2004) et des approches biochimiques récentes ont permis de purifier un complexe d'incorporation (Foltz *et coll.* 2006; Okada *et coll.* 2006).

Le variant d'histone H3.3 est enrichi dans les zones de transcription active chez les insectes, les plantes et les hommes (Ahmad *et coll.* 2002; McKittrick *et coll.* 2004; Chow *et coll.* 2005). H3.3 est chaperonné par une protéine spécifique, HIRA, qui le différencie des autres H3 et favorise son incorporation dans les régions transcriptionnellement actives (Tagami *et coll.* 2004). Ce variant est enrichi en marques de transcription active, à savoir une hyper-acétylation et une diméthylation de H3K36 et H3K79 (Hake *et coll.* 2006).

H3.1 et H3.2 ont été longtemps confondus, mais l'étude de leurs modifications post traductionnelles suggèrent des rôles distincts (Hake *et coll.* 2006). H3.2 est méthylé sur H3K27 et serait impliqué dans la répression de l'expression des gènes, alors que H3.1 possède des marques associées à l'activation des gènes (H3K14ac) et à la répression de la transcription (H3K9me2).

1.2.1.3 Les variants de H2A

L'histone H2A est dotée de longues extensions de part et d'autre de l'histone fold: sa queue N-terminale s'intercale entre les deux tours d'ADN nucléosomal, alors que une partie de son extension C-terminale interagit avec le tétramère H3-H4 via un motif appelé "docking domain" (Luger *et coll.* 1997; Suto *et coll.* 2000). Comme nous le verrons ce domaine est essentiel à l'accrochage du dimère H2A-H2B sur le tétramère (H3-H4)₂ et joue un rôle important dans la dynamique du nucléosome. Une fois présent dans le nucléosome H2A présente en surface une région nommée « patch acide » dont l'interaction avec la partie N-terminale de H4 est essentielle à la formation d'une fibre compacte de chromatine (Horn *et coll.* 2002; Zhou *et coll.* 2007).

L'histone H2A est celui qui compte le plus grand nombre de variants (Figure 14). Certains de ces variants se caractérisent par des divergences de séquence importantes (Malik *et coll.* 2003). Quelques variants de H2A sont présents chez tous les eucaryotes comme

H2A.X et H2A.Z, d'autres n'existent que chez les vertébrés comme macroH2A, certains comme H2A.Bbd ne sont présents que chez les mammifères (Malik *et coll.* 2003; Eirin-Lopez *et coll.* 2008).

1.2.1.3.1 H2A.Z

Le variant H2A.Z est présent chez les mammifères, les oiseaux (H2A.F), la drosophile (H2Av), *C. elegans*, les oursins (H2AZ/F), différents champignons dont *Tetrahymena* (H2Ahv1) et la levure (Htz1) (Raisner *et coll.* 2005). Chez la drosophile, le variant d'histone H2Av regroupe les fonctions attribuées à H2A.Z et H2A.X (voir partie suivante). Les variants homologues à H2A.Z ont été très conservés au cours de l'évolution. H2A.Z est relativement divergent par rapport à l'histone canonique, puisque les deux protéines ne partagent que 63 % d'homologie.

La résolution de la structure du nucléosome contenant H2A.Z révèle une différence dans l'affinité de la liaison au tétramère (Suto *et coll.* 2000). La perte de trois liaisons hydrogènes déstabilise légèrement l'interaction entre H3 et H2A.Z (Suto *et coll.* 2000). A l'opposé, la région acide plus importante présentée par le dimère H2A.Z-H2B à la surface de l'octamère pourrait être importante pour lier la queue de l'histone H4 ou d'autres interacteurs non-histones (Suto *et coll.* 2000) et elle pourrait favoriser la formation de la fibre de 30 nm.

Les différentes études réalisées *in vitro* des propriétés physiques du nucléosome variant contenant H2A.Z aboutissent à des conclusions différentes selon les techniques utilisées. Certaines mesures concluent que le nucléosome contenant H2A.Z serait moins stable (Abbott *et coll.* 2001) d'autres à une plus grande stabilité du nucléosome H2A.Z (Fan *et coll.* 2002; Park *et coll.* 2004; Jin *et coll.* 2007). La cristallisation de nucléosomes où un seul des deux dimères comporte H2A.Z semble peu favorable du fait de la réorganisation de l'interface H2A.Z-H2B (Suto *et coll.* 2000).

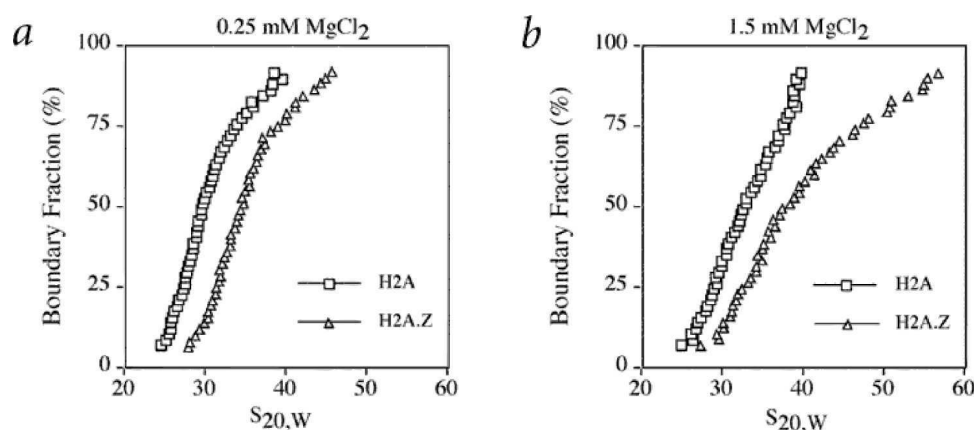


Figure 15 : Effet de l'incorporation de H2A.Z sur la compaction de la fibre de chromatine

Lors d'expériences d'ultracentrifugation, une fibre variante H2A.Z présente un coefficient de sédimentation $S_{20,W}$ plus important qu'une fibre conventionnelle, que se soit à basse concentration (a) ou à forte concentration (b) en $MgCl_2$. Adapté de (Fan *et coll.* 2002).

Une observation potentiellement importante est celle réalisée par Flaus *et coll.* (Flaus *et coll.* 2004) sur la mobilité des nucléosomes H2A.Z. Il a été montré *in vitro* que les nucléosomes H2A.Z diffusent thermiquement pour des températures autour 30°C beaucoup plus rapidement que les nucléosomes conventionnels. Cette propriété a été rapprochée de la forte dépendance des cellules par rapport au facteur de remodelage SWI/SNF dans des lignées

où ce variant a été invalidé (Santisteban *et coll.* 2000). H2A.Z et les facteurs de remodelage seraient donc des mécanismes redondants pour la mobilité nucléosomale. Une autre étude par Li *et coll.* (2005) montre que les positions préférentiellement occupées par H2A.Z peuvent être dans certains cas différentes sur des systèmes reconstitués.

In vitro, la présence de H2A.Z facilite la formation de fibres nucléosomales compactes, mais inhibe leur capacité à s'oligomériser (Fan *et coll.* 2002) (Figure 15). Ces données suggèrent que la chromatine contenant H2A.Z pourrait être présente dans l'hétérochromatine. Parallèlement, il a été montré que l'absence de H2A.Z perturbe *in-vivo* la localisation de HP1alpha, une protéine connue pour être liée à la constitution et à la compaction de l'hétérochromatine et que HP1alpha se lie préférentiellement *in-vitro* à des chromatines reconstituées avec H2A.Z (Fan *et coll.* 2004). Ces résultats suggèrent que la capacité pour les chromatines H2A.Z de former des fibres compactes jouerait un rôle dans la formation de l'hétérochromatine péracentrique.

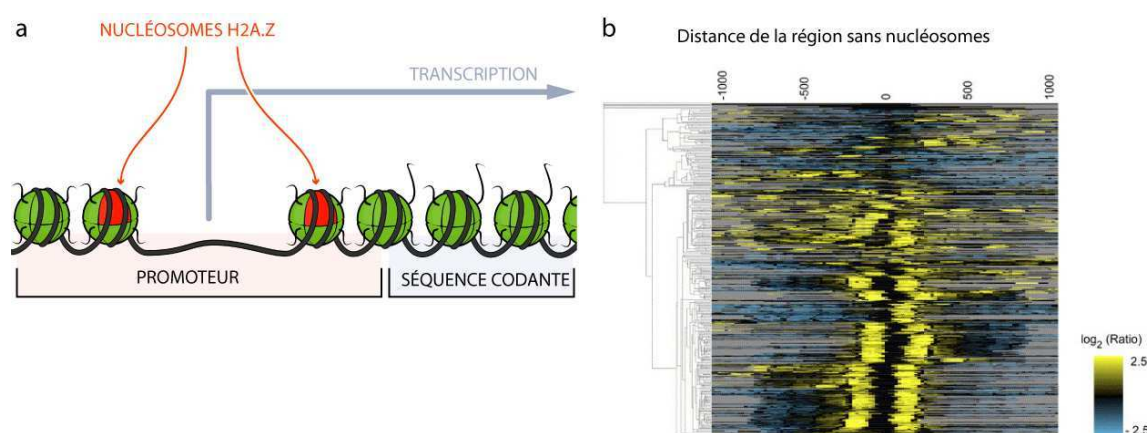


Figure 16 : Implication de H2A.Z dans l'architecture des promoteurs

(a) H2A.Z est présent de part et d'autre d'un vide nucléosomale (ou NFR pour *Nucleosome Free Region*) au niveau des promoteurs. (b) Enrichissement en H2A.Z au niveau des promoteurs pour différents gènes. On remarque la présence de deux maximums locaux de probabilité (en jaune) de part et d'autre d'une zone appauvrie (en noir). Adapté de (Boulard 2007) et (Raisner *et coll.* 2005).

Différents travaux ont permis de définir la carte à haute résolution (20 pb) du positionnement de H2A.Z chez la levure, grâce à l'utilisation de puces haute densité composées de sondes chevauchantes (Raisner *et coll.* 2005). Différents groupes ont déterminé les loci où les nucléosomes contenant H2A.Z sont positionnés à l'échelle du génome (Guillemette *et coll.* 2005; Li *et coll.* 2005; Raisner *et coll.* 2005; Zhang *et coll.* 2005; Millar *et coll.* 2006; Barski *et coll.* 2007). Tous ces travaux s'accordent sur le point qu'une fraction importante des nucléosomes contenant H2A.Z se trouve localisée au niveau des promoteurs. La corrélation entre la présence de H2A.Z sur le promoteur et l'activité du gène n'est pas admise par toutes les études et se trouve encore débattue. Une autre analyse à haute résolution, réalisée cette fois chez l'homme en utilisant la technique de séquençage haut débit SOLEXA®, démontre que contrairement à ce qui a été observé chez la levure, la présence de H2A.Z sur le promoteur est corrélée avec une transcription active (Barski *et coll.* 2007).

Ces études à haute résolution du positionnement de H2A.Z sur le génome montrent toutes que H2A.Z est fortement enrichi aux abords de la région sans nucléosome (*nucleosome free region* ou NFR) du promoteur (Raisner *et coll.* 2005; Barski *et coll.* 2007). Ces travaux montrent que deux nucléosomes contenant H2A.Z encadrent la NFR du promoteur, chez la levure et chez l'homme (Figure 16) (Raisner *et coll.* 2005; Barski *et coll.* 2007). Ces données ont abouti à l'identification d'une séquence de 22 pb suffisante pour promouvoir à la fois la

formation d'une NFR et l'incorporation de H2A.Z dans les deux nucléosomes flanquant cette région (Raisner *et coll.* 2005). Cette séquence, fréquemment présente dans les promoteurs chez la levure, semble être le signal compris dans la séquence d'ADN et favorisant la déposition de H2A.Z.

Chez la levure, l'acétylation des histones contribue également à diriger l'incorporation de H2A.Z vers les régions euchromatiques (Raisner *et coll.* 2005; Zhang *et coll.* 2005). L'incorporation de H2A.Z dans la chromatine est spécifiquement prise en charge par le complexe de remodelage SWR1 (Krogan *et coll.* 2003; Kobor *et coll.* 2004; Krogan *et coll.* 2004; Mizuguchi *et coll.* 2004). Une autre chaperonne d'histone appelée Chz1 dépose préférentiellement le dimère H2A.Z-H2B (Luk *et coll.* 2007).

L'ensemble des données disponibles suggère donc que H2A.Z est impliqué dans plusieurs processus cellulaires, parmi ceux-ci la formation d'une architecture de la chromatine particulière sur les promoteurs autour des NFR ou le maintien de la structure de l'hétérochromatine péricentrique. On peut supposer que ces fonctions distinctes voire antagonistes sont probablement liées à la dynamique particulière de ces nucléosomes et à leurs mécanismes de déposition distincts.

1.2.1.3.2 H2A.X

Le variant H2A.X est présent au sein de l'ensemble du règne animal. C'est la seule histone de la famille H2A présente chez la levure, chez certains champignons et chez le parasite *Giardia* (Malik *et coll.* 2003). L'extrémité carboxy-terminale d'H2A.X contient 20 acides aminés de plus qu'H2A, et notamment le motif très conservé SQE (Li *et coll.* 2005) (Figure 14). La phosphorylation de cette sérine 139 est une marque forte, associée à la fonction de ce variant (voir ci-dessous). Chez les mammifères, un motif SQ ou TQ est présent en amont de ce motif (position 136 pour le résidu phosphorylable) et peut également être phosphorylé (Rogakou *et coll.* 2000). Enfin, une cassette GKK située quelques résidus en amont a également été très conservée au cours de l'évolution, ce qui suppose un rôle fonctionnel important de ces trois acides aminés et de leurs modifications post-traductionnelles (Li *et coll.* 2005)

Une phosphorylation massive d'H2A.X sur sa sérine 139 a lieu lors de la réparation d'une cassure double brins de l'ADN. La forme phosphorylée de H2A.X, appelée γ H2A.X est détectée dans tous les contextes cellulaires mettant en jeu des cassures double brins : agression par des agents extérieurs, apoptose, réplication, recombinaison des zones V(D)J lors de la maturation des lymphocytes et de la recombinaison homologue lors de la méiose. Trois kinases de la famille des PI3 kinases peuvent phosphoryler H2A.X : ATM, DNA-PK et ATR (Stiff *et coll.* 2004). La phosphorylation d'H2A.X pourrait avoir un rôle direct d'ouverture de la chromatine. Sa sérine 139 est située au niveau du site de fixation des histones de liaison et sa phosphorylation pourrait entraîner l'ouverture de la fibre de 30 nm, en chassant les histones de liaison (Li *et coll.* 2005). H2A.X n'est pas impliqué dans le recrutement initial des facteurs essentiels à la réparation des cassures doubles brins, mais dans leur accumulation (Celeste *et coll.* 2003). Il est reconnu par Arp4, sous unité commune des complexes de remodelage NuA4, Ino80 et Swr1 (Downs *et coll.* 2004). Ces complexes permettraient alors de modifier la structure de la chromatine, de telle sorte que la réparation de l'ADN puisse avoir lieu.

1.2.1.3.3 macroH2A

MacroH2A (mH2A) est un variant d'H2A contenant une région C-terminale de très grande taille (20 kDa) (Pehrson *et coll.* 1992). On retrouve deux isoformes alléliques, mH2A1

et mH2A2, identiques à 80% (Chadwick *et coll.* 2001; Chadwick *et coll.* 2001; Costanzi *et coll.* 2001). L'ARN transcrit du gène mH2A1 subit un épissage différentiel conduisant aux formes mH2A1.1 et mH2A1.2, exprimées spécifiquement dans certains tissus (Chadwick *et coll.* 2001).

Le variant mH2A est associé à une répression forte de la transcription, et serait notamment enrichi au sein du chromosome X inactif (Costanzi *et coll.* 1998; Costanzi *et coll.* 2001). De plus, mH2A est détecté dans des foyers hétérochromatiques apparaissant dans les cellules quiescentes ou sénescents (Grigoryev *et coll.* 2004; Zhang *et coll.* 2005). MacroH2A a un effet répresseur de la transcription à deux niveaux. In vitro, il a été montré qu'il bloque l'action de la HAT p300, ce qui bloque la cascade de modifications post-traductionnelles des histones nécessaires à l'initiation de la transcription (Doyen *et coll.* 2006). Cet effet a été confirmé in vivo, car les nucléosomes contenant mH2A sont moins acétylés que ceux contenant H2A (Chakravarthy *et coll.* 2005), et l'interaction de mH2A avec HDAC1 et HDAC2 minimise l'acétylation des histones voisines.

De plus, mH2A bloque l'action de complexes de remodelage de la chromatine, nécessaire à la mobilisation des nucléosomes lors de la transcription (Doyen *et coll.* 2006). La boucle L1 de macroH2A, située entre les deux premières hélices du fold histone, serait responsable de ce blocage. Le domaine C terminal de mH2A, appelé couramment domaine macro, a été cristallisé par plusieurs groupes (Chakravarthy *et coll.* 2005; Kustatscher *et coll.* 2005). Le domaine macro de mH2A1.1 est capable de lier un métabolite produit lors de la déacétylation par les HDAC de classe III, appelé O-acetyl-ADP-ribose. Par contre, le domaine macro de mH2A1.2 n'est capable de lier ce métabolite. Les conséquences fonctionnelles de cette liaison ne sont pas encore comprises, mais cette interaction renforce les liens entre métabolisme cellulaire et indexation des informations épigénétiques au sein de la chromatine.

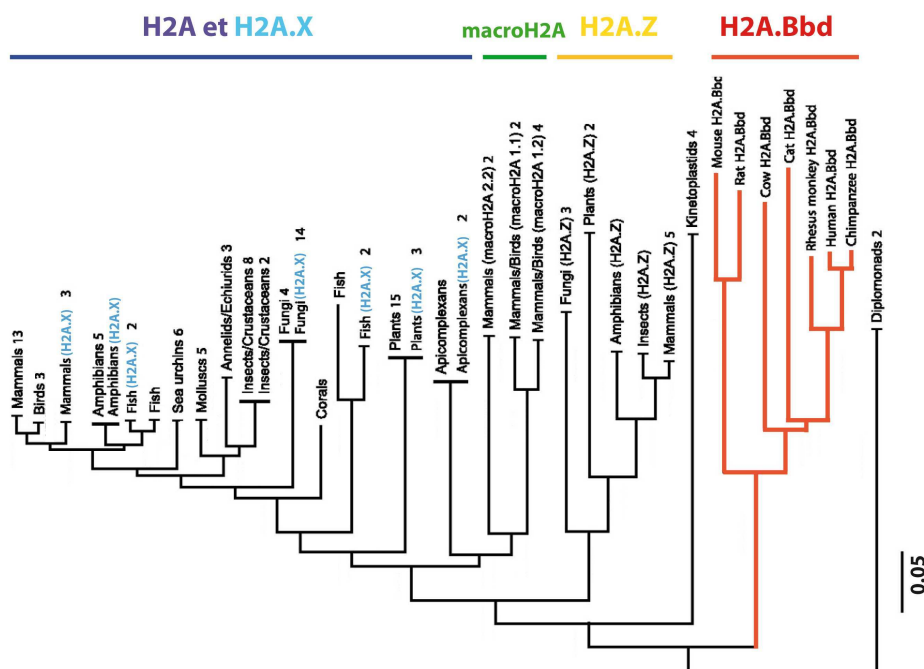


Figure 17 : Arbre phylogénétique de H2A.

La famille formée par les homologues de H2A contient principalement quatre types d'histone variants H2A.X, macroH2A, H2A.Z et H2A.Bbd. On remarque que pour bon nombre d'espèces le variant H2A.X a divergé très tardivement de l'histone conventionnel. A l'opposé H2A.Bbd est un histone très divergent et présent seulement pour les mammifères. Adapté de (Gonzalez-Romero *et coll.* 2008).

1.2.1.3.4 H2A.Bbd

Découvert il y a 6 ans seulement, H2A.Bbd est un variant de l'histone H2A présent exclusivement chez les mammifères (Eirin-Lopez *et coll.* 2008). Contrairement aux autres histones qui sont phylogéniquement très conservés (Malik *et coll.* 2003), H2A.Bbd présente des variations de séquences importantes entre les espèces et évolue rapidement (Eirin-Lopez *et coll.* 2008; Gonzalez-Romero *et coll.* 2008) (Figure 17). Les causes de l'évolution rapide de ce variant restent à élucider (Eirin-Lopez *et coll.* 2008). H2A.Bbd ne partage que 48 % d'identité avec l'histone canonique H2A (Chadwick *et coll.* 2001) ce qui fait de lui l'histone variant le plus spécialisé à ce jour (Figure 14).

H2A.Bbd est plus petit que l'histone canonique (115 acides aminés seulement soit 12.7 kDa). Une de ses particularités est la présence d'une extension de résidus arginine dans son domaine N-terminal (Figure 18). Les acides aminés ciblés par les modifications post-traductionnelles ne sont pas conservés dans la séquence de H2A.Bbd, suggérant une régulation particulière de ce variant (Chadwick *et coll.* 2001). En outre, à la différence de sa contrepartie conventionnelle, H2A.Bbd ne présente pas de région acide en surface (Zhou *et coll.* 2007).

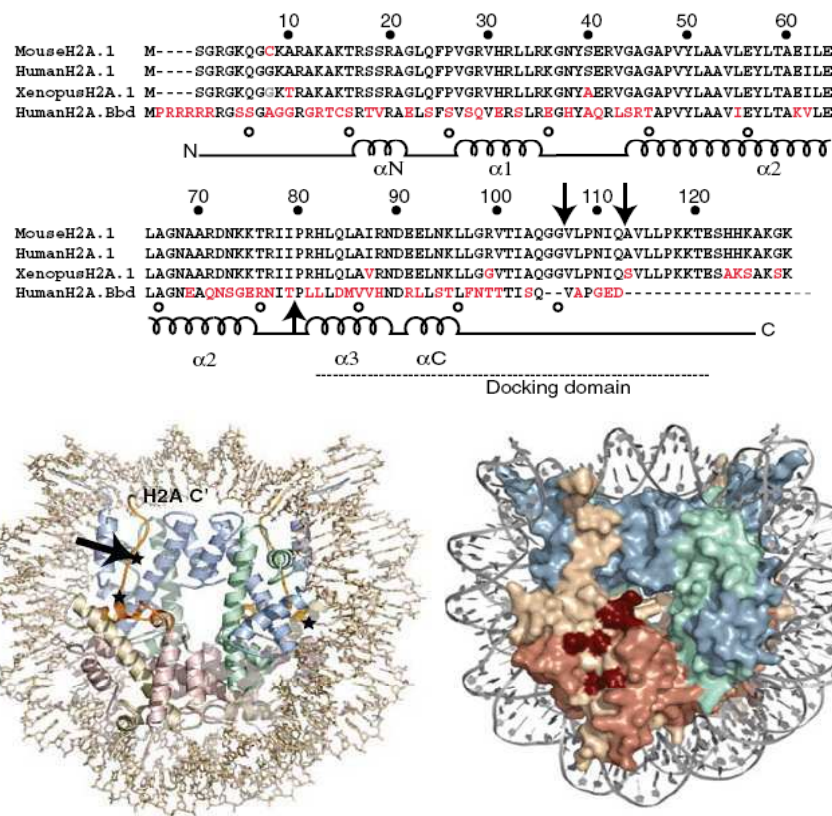


Figure 18 : H2A.Bbd, séquence et structure

(en haut) Comparaison des séquences de H2A et H2A.Bbd. (en bas à gauche) Position du domaine d'accrochage de H2A (indiqué par la flèche noire) dans la structure du nucléosome. (en bas à droite) surface du nucléosome et position du 'patch acide' (en rouge foncé). Adapté de (Bao *et coll.* 2004; Caterino *et coll.* 2007)

A l'inverse de macroH2A, H2A.Bbd (*bar body deficient*) est exclu de la zone dense dite du corpuscule de Barr qui correspond au Xi (chromosome sexuel X inactif). Cette exclusion du Xi a pu être observée en sur-exprimant H2A.Bbd dans des cellules en cultures

(Chadwick *et coll.* 2001). Sa localisation dans des zones riches en H4K12 acétylé (Figure 19), suggère que sa présence pourrait avoir un rôle positif sur la transcription (Chadwick *et coll.* 2001).

Cette hypothèse est supportée par des expériences *in vitro* montrant qu'un chapelet de nucléosomes contenant H2A.Bbd est plus efficacement transcrit et que les histones en sont plus efficacement acétylés (Angelov *et coll.* 2004). Des mesures de FRAP, FRET et de sédimentation, mettent en évidence que le nucléosome variant H2A.Bbd est moins stable qu'un nucléosome canonique, ce qui signifie que le dimère H2A.Bbd-H2B peut s'éjecter et peut être transféré plus facilement qu'un dimère H2A-H2B (Angelov *et coll.* 2004; Bao *et coll.* 2004; Gautier *et coll.* 2004). L'instabilité du dimère H2A.Bbd-H2B implique que le nucléosome H2A.Bbd est une structure plus ouverte facilitant l'accès aux HAT (histones acétyltransférases), aux facteurs de transcription et à la polymérase; ceci pourrait expliquer le rôle positif de H2A.Bbd sur la transcription. Cette plus grande accessibilité de l'ADN du nucléosome H2A.Bbd pourrait de façon générale faciliter la mise en oeuvre des processus nécessitant la liaison de facteurs à l'ADN. Ainsi, il a récemment été montré que le nucléosome H2A.Bbd est plus permissif à la réparation par excision de base (BER) que le nucléosome canonique qui représente une barrière aux mécanismes de la réparation (Menoni *et coll.* 2007). Des expériences de digestion du nucléosome H2A.Bbd par la nucléase micrococcalle suggèrent que seulement 118 pb sont protégés de l'enzyme à l'intérieur de ces nucléosomes (Bao *et coll.* 2004) alors que la longueur d'ADN protégée pour un nucléosome conventionnel est de 146 pb. Cependant, une digestion plus restreinte des nucléosomes variants H2A.Bbd conduit à une longueur complexée de 130 pb (Doyen *et coll.* 2006). Pour comprendre ces différences, nous pourrions comparer ces mesures dynamiques d'accessibilité avec des mesures structurales obtenues entre autres par microscopie à force atomique (chapitre 3).

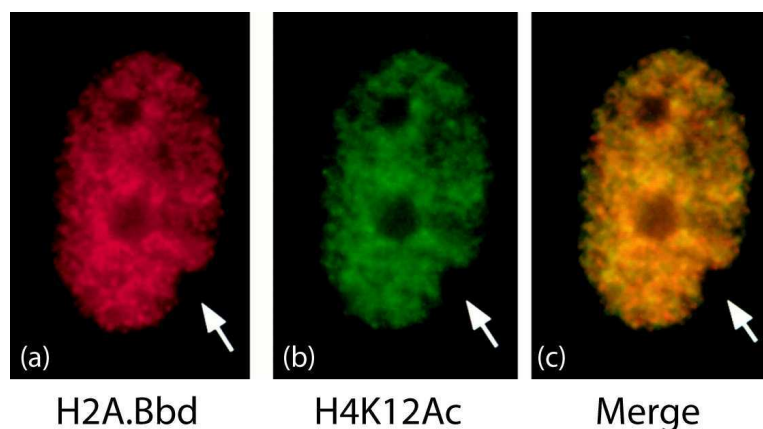


Figure 19 : Corrélation entre présence de H2A.Bbd et zones actives de la chromatine

(a) Marquage de H2A.Bbd. (b) Marquage de l'acétylation de la lysine 12 présente dans les régions actives de la chromatine. (c) Somme des deux images (a) et (b). On remarque la co-localisation des zones rouges et vertes qui donne lieu à une coloration jaune. En outre, le variant d'histone H2A.Bbd est absent des zones inactives (ici le chromosome X inactif Xi indiqué par la flèche). Adapté de (Chadwick *et coll.* 2001)

Il a été montré que les facteurs de remodelage comme SWI/SNF et ACF (cf. section 1.2.3) étaient incapables de faire glisser de tels nucléosomes (Angelov *et coll.* 2004). Dans ce cas, la liaison des facteurs de remodelage ne semble pas affectée. Une étude réalisée par ultracentrifugation sur des chapelets de nucléosomes H2A.Bbd montre que la compaction de telles fibres est inférieure à celles de nucléosomes conventionnels (Zhou *et coll.* 2007) et que l'ajout d'ions Mg^{2+} ne permet pas de compacter ces fibres. De plus, cette

étude suggère que l'absence poche acide en surface de H2A.Bbd induit cette structure relâchée et favorise l'oligomérisation des chapelets nucléosomiaux. Néanmoins, ce type de mesure globale ne permet pas de remonter à la structure microscopique des objets étudiés et reste sujet à un certain nombre d'artéfacts liés aux interactions entre fibres.

Très peu de données sont disponibles quant à la localisation de H2A.Bbd dans le noyau et sur le génome. Son rôle biologique n'est pas connu. Chez l'homme, H2A.Bbd est détecté par northern-blot dans le testicule et par RT-PCR dans certaines lignées cellulaires (Chadwick *et coll.* 2001). Récemment H2A.Bbd a été également détecté chez la souris à un plus faible niveau dans d'autres tissus (cerveau, foie, rein, prostate) (Eirin-Lopez *et coll.* 2008).

1.2.1.4 Conclusion sur les variants d'histones

Nous avons vu dans cette partie que l'incorporation de variants d'histone constitue une modification des propriétés fonctionnelles et structurales du nucléosome. Elle permet à la fois le marquage de certaines régions de la chromatine en vue du recrutement de facteurs spécifiques (comme CENPA) et la modification locale de la dynamique et de la structure de la chromatine (comme H2A.Z). Nous verrons dans la partie résultat que dans le cas de H2A.Bbd, l'incorporation de cet histone induit une modification structurale et dynamique importante de la chromatine.

1.2.2 Les facteurs de remodelage

La dernière des stratégies qui permet la modulation de l'accès à l'ADN chromatinien est le recrutement d'une large famille d'enzymes qui utilise l'énergie d'hydrolyse de l'ATP pour modifier de manière transitoire et localisée la structure et la dynamique de la chromatine : les facteurs de remodelage de la chromatine.

Pour aborder cette famille de complexes protéiques commençons par un bref historique qui présentera comment ils ont été découverts. Nous verrons ensuite l'état actuel des connaissances sur les différentes classes de facteurs de remodelage. Nous nous concentrerons néanmoins sur deux complexes SWI/SNF et RSC avec lesquels nous avons plus particulièrement travaillé.

1.2.2.1 Historique

Le complexe SWI/SNF (pour mating type **SW**itching/**S**ucrose **N**on **F**ermenting) est le premier complexe de remodelage de la chromatine à avoir été isolé chez la levure. Plusieurs composants de ce complexe ont été originellement identifiés dans des cribles génétiques comme des régulateurs positifs de la transcription du gène de l'endonucléase *HO* (gènes de la famille SWI) ou de l'invertase *SUC2*, requise pour la croissance sur saccharose (gènes de la famille SNF; pour une revue, voir (Winston *et coll.* 1992)). Des études génétiques et biochimiques ont, par la suite, montré que ces différentes protéines forment un même complexe, composé d'au moins 11 sous-unités et d'une masse moléculaire de 1.15 MDa (Cote *et coll.* 1994) (Figure 21). Chez *S. cerevisiae*, SWI/SNF n'est pas essentiel à la viabilité cellulaire. Les mutations dans les différentes sous-unités donnent des phénotypes très variés (défauts de croissance, incapacité à utiliser certaines sources de carbone, défauts dans le changement de type sexuel). L'étude de mutants du complexe SWI/SNF a permis d'établir un lien entre ce complexe et le remodelage de la chromatine. Les gènes du groupe SIN sont

définis comme des suppresseurs du phénotype *swi/snf*-. Plusieurs mutations *sin* correspondent à des mutations dans les gènes codant les histones H3 et H4 (Winston *et coll.* 1992). La déplétion partielle des histones H2A et H2B permet également de supprimer ce phénotype (Hirschhorn *et coll.* 1992). Ces données suggèrent donc que la déstabilisation de la structure chromatinienne et le fonctionnement de SWI/SNF sont liés. Des expériences de sensibilité de la chromatine à la digestion par des nucléases sur le gène *SUC2* ont démontré la "fonction chromatinienne" de SWI/SNF. L'activation de la transcription du gène s'accompagne d'un changement du profil de digestion. Des mutations dans les gènes codant les sous-unités Snf2 ou Snf5 abolissent à la fois l'induction transcriptionnelle et la modification de la structure chromatinienne du gène *SUC2*. Celles-ci sont en partie rétablies lorsque la quantité d'histones H2A et H2B est artificiellement diminuée (Hirschhorn *et coll.* 1992; Wu *et coll.* 1997). Ces différentes observations font penser que les nucléosomes sont déplacés, permettant ainsi l'accès de la machinerie de transcription. Le complexe SWI/SNF est capable de stimuler la fixation d'un activateur transcriptionnel dérivé de Gal4. Il a été établi que SWI/SNF est capable de modifier le positionnement et la structure des nucléosomes de manière ATP-dépendante (pour revue (Kingston *et coll.* 1999)). L'activité ATPase est portée par la sous-unité Swi2/Snf2 (Laurent *et coll.*, 1993). Cette protéine définit une classe d'ATPase impliquée comme nous le verrons dans le remodelage de la chromatine .

1.2.2.2 Les différentes classes de remodeleurs

Le polypeptide SWI2/SNF2 contient 5 motifs également présents dans un grand nombre de protéines interagissant toutes avec les NTPs et qui comprend par exemple les hélicases ADN et ARN. Des études comparative de ces hélicases (Gorbalenya *et coll.* 1989; Eisen *et coll.* 1995) montrent que l'on peut séparer cette superfamille en trois groupes (SF1, 2 et 3) et de nombreux sous-groupes (voir la Figure 20). La superfamille SF2 comprend plusieurs familles comme les hélicases DEAD Box ou DEAH box et ce que l'on appelle la famille « Snf2-like ». A la suite de la découverte de la possibilité pour les complexes contenant Sth1 et *swi2/snf2* de remodeler la chromatine, des études ont vérifié que les membres de cette famille « Snf2-like » sont autant de facteurs de remodelage de la chromatine liés à d'autres sous-unités et ayant des mécanismes différents. Ces différents complexes de remodelage sont classés en quatre groupes principaux ou sous familles, SWI2/SNF2, ISWI, MI-2/CHD et INO80/Swr1, en fonction de leur sous-unité catalytique.

La Figure 21 montre une représentation schématique des ATPases Swi2/Snf2, ISWI, Mi-2. Leur domaine ATPase est conservé et ressemble à celui d'ADN hélicases. Celui de la protéine Ino80 de *S. cerevisiae* a la particularité d'être divisé en deux sous-domaines. Aucune activité hélicase n'a été démontrée pour ces complexes de remodelage à l'exception du complexe de levure INO80 (Shen *et coll.* 2000). Le domaine ATPase est associé à un autre motif spécifique de chaque classe. Les ATPases de type Snf2/*swi2* possèdent un motif de type bromodomaine. Le domaine ATPase des protéines homologues à Iswi est couplé à un module de liaison à l'ADN SANT. La famille Mi-2 est quant à elle caractérisée par la présence d'un chromodomaine. La Figure 22 présente quelques complexes de la sous-famille *swi2-snf2* isolés chez la levure, la drosophile et l'homme. Le nombre de sous-unités de ces différents complexes varie énormément. Il est probable que plusieurs sous-unités servent de plate-forme d'interaction et soient impliquées dans le ciblage de l'activité de ces complexes (Phelan *et coll.* 1999). Ces différents complexes ont des activités différentes et agissent vraisemblablement selon des modes différents.

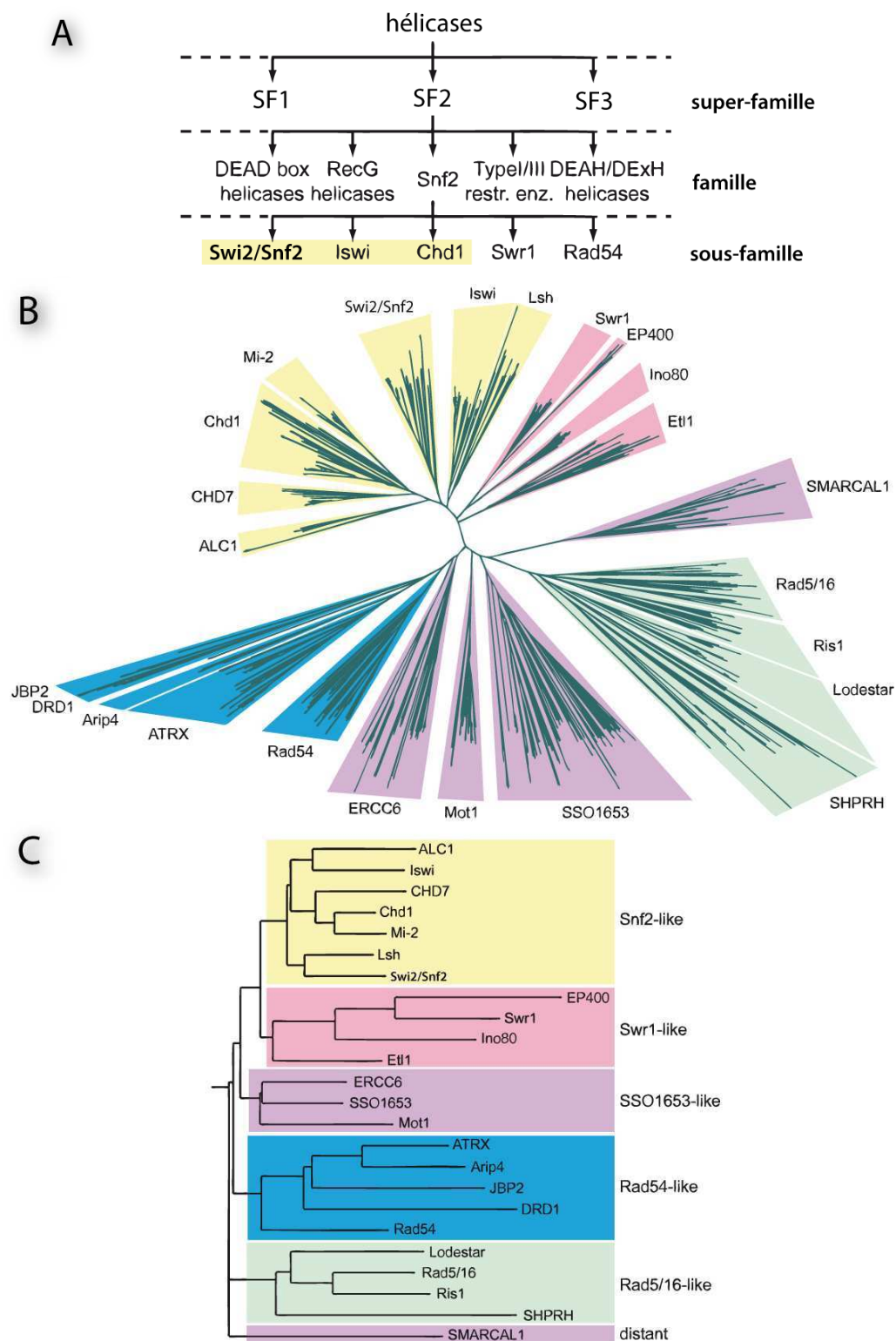
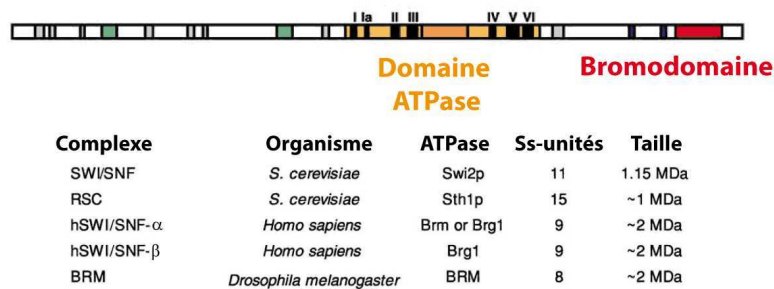


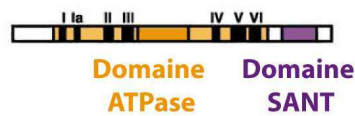
Figure 20 : Arbre phylogénétique des hélicases ATP-dépendantes.

Les hélicases ATP dépendantes constituent un vaste ensemble de protéines incluant trois super-familles (SF1, SF2 qui comprend entre autres les facteurs de remodelage, SF3). Les facteurs de remodelage quant à eux (famille Snf 2) se répartissent en plusieurs sous-famille selon leur homologie avec la sous-unité ATPase de γ SWI/SNF, swi2/snf2. D'après (Gorbalenya *et coll.* 1989; Eisen *et coll.* 1995)

Sous-famille Swi2/snf2



Sous-famille ISWI



Sous-famille Mi-2

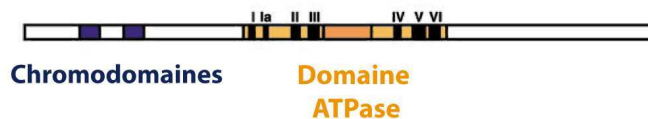


Figure 21 : Différents domaines de la sous-unité catalytique des facteurs de remodelage

La structure du domaine ATPase en 7 sous domaines est fortement conservée entre les différentes sous familles de moteurs. En outre, chacun des types de sous-unité catalytique possède des domaines capables de lier l'ADN ou les histones (Bromodomaine pour swi2/snf2, domaine SANT pour ISWI et chromodomaine pour Mi-2). On peut remarquer que les complexes de la sous-famille swi2/snf2 possèdent de nombreuses sous-unités (entre 8 et 15). A l'opposé les complexes de la sous famille ISWI ne possèdent qu'entre deux et quatre sous-unités additionnelles ce qui suggère une plus grande spécification de cette sous-famille. D'après (Smith *et coll.* 2005).

Yeast		Drosophila		Human	
SWI/SNF	RSC	BAP	PBAP	BAF	PBAF
Swi2/Snf2	Sth1	Brahma	Brahma	BRG1 or hBRM	BRG1
Swi1/Adr6		OSA		BAF250	
	Rsc1, Rsc2, Rsc4		Polybromo		Polybromo/BAF180
	Rsc9*		BAP170*		
Swi3	Rsc8	Moir	Moir	BAF170 & BAF155	BAF170 & BAF155
		BAP111	BAP111	BAF57	BAF57
Swp73	Rsc6	BAP60	BAP60	BAF60a	BAF60a or BAF60b
Swp61/Arp7	Rsc11/Arp7	BAP55	BAP55	BAF53	BAF53
Swp59/Arp9	Rsc12/Arp9				
		actin	actin	actin	actin
Snf5	Sth1	Snr1	Snr1	hSNF5/INI1	hSNF5/INI1
	Rsc5, 7, 10, 13-15				
	Rsc3, Rsc30				
Swp82					
Swp29/Tfg3/TAF30/Anc1					
Snf6, 11					

Figure 22 : Composition des complexes de la sous-famille 'swi2/snf2'.

Les sous-unités conservées sont regroupées horizontalement. On remarque que bon nombre de sous-unités de RSC et SWI/SNF sont apparentées. D'après (Mohrmann *et coll.* 2005)

1.2.2.2.1 *Swi2/Snf2*

Cette sous-famille est la plus étudiée de toutes. Nous nous restreindrons à SWI/SNF, RSC et leur orthologues.

1.2.2.2.1.1 SWI/SNF

Comme nous l'avons vu précédemment le complexe SWI/SNF est un facteur ATP-dépendant modifiant la transcription de certains gènes et changeant la structure de la chromatine. Il est composé de 11 sous unités encodés par les gènes SWI1, SWI2/SNF2, SWI3, SNF5, SNF6, SNF11, SWP82, SWP73, SWP29, ARP7, (Peterson *et coll.* 1994; Cairns *et coll.* 1996; Cairns *et coll.* 1996; Cairns *et coll.* 1998; Peterson *et coll.* 1998). Ce complexe n'est pas essentiel pour la viabilité. La sous-unité catalytique, Swi2p, contient un bromodomaine, une région AT-hook (ou crochet AT, qui est un motif de liaison à l'ADN reconnaissant préférentiellement les sillons mineurs de régions riches en nucléotides A et T (Reeves *et coll.* 1990)), ainsi qu'une hélicase.

Le rôle de ces domaines reste soumis à hypothèses. En comparant l'activité de ces domaines chez d'autres protéines, il a été postulé, comme nous le verrons, que ces domaines seraient importants pour le ciblage de la sous-unité ATPase (Aravind *et coll.* 1998; Boyer *et coll.* 2004) Néanmoins comme leur délétion ne modifie pas la liaison et l'activité de remodelage des facteurs de cette famille de remodeleurs il a été aussi proposé que ces domaines permettent une liaison plus forte de cette sous-unité avec les autres parties du complexe et son substrat. Des homologues de cette sous-unité sont présents chez tous les eucaryotes y compris la Drosophile où l'on trouve la protéine Brahma ou BRM donnant lieu aux complexes BAP et PBAP et l'homme où l'on trouve les protéines hBRM et BRG1 donnant lieu aux complexes BAF/hSWI/SNF-A. Il est à noter la présence chez la levure d'une paralogue de Swi2p appelé Sth1 et qui donne lieu à un complexe différent appelé RSC. L'hydrolyse de l'ATP par cette sous-unité Swi2p se fait à une vitesse maximum d'environ 1000 ATP/min en présence de nucléosome ou d'ADN (Boyer *et coll.* 2000). Malgré la forte homologie avec les hélicases, aucun ADN simple brin n'a pu être mis en évidence au cours du remodelage (Cote *et coll.* 1994; Quinn *et coll.* 1996; Cote *et coll.* 1998).

1.2.2.2.1.1.1 SWI/SNF et transcription

La perte de fonction de SWI/SNF se traduit par des phénotypes très variés. Des études récentes par puces à ADN ont montré que SWI/SNF n'a pas un rôle général dans la transcription. Il n'est requis (directement ou indirectement) pour la transcription que de 3 à 6 % des gènes selon les études (Holstege *et coll.* 1998; Sudarsanam *et coll.* 2000). De plus, *in vivo* SWI/SNF a un rôle positif et négatif sur la transcription. Ceci indique que ce complexe contribue à rendre l'ADN plus ou moins accessible selon les gènes. Les effets transcriptionnels observés sont la résultante d'effets directs et indirects (via des régulateurs pour ces derniers). Une partie des dérégulations observées est due non pas à l'action de SWI/SNF au niveau d'un gène particulier, mais à l'action de SWI/SNF sur la transcription de certains régulateurs. Par exemple, les protéines Pho2 et Pho4 sont des activateurs transcriptionnels du gène *PHO5*. Dans un mutant *snf2⁻* cultivé en milieu riche, l'expression du gène *PHO5* est réprimée, mais celles des gènes *PHO2* et *PHO4* ne varie pas. Ce résultats suggère que la répression de *PHO5* est liée à une intervention directe de SWI/SNF au niveau de ce gène. Inversement, pour les gènes transcrits spécifiquement dans les souches du type sexuel **a**, la diminution de la quantité de ces transcrits est provoquée par la répression de la transcription de leurs régulateurs (Sudarsanam *et coll.* 2000).

La répartition dans le génome des gènes dont la transcription est dépendante de SWI/SNF est homogène. Ceci montre que ce complexe ne régit pas la transcription de domaines chromatiniens particuliers, mais que ce contrôle s'exerce individuellement sur chaque gène (Holstege *et coll.* 1998; Sudarsanam *et coll.* 2000). Le fait que SWI/SNF ne soit pas requis pour la transcription de la totalité du génome indique soit qu'il n'intervient effectivement qu'au niveau d'un nombre restreint de gènes, soit que sa fonction est partiellement redondante avec celle d'un autre facteur (de remodelage ou de modification des histones). Plus généralement, il semble que SWI/SNF serait impliqué dans la régulation des gènes PolIII. Enfin, une récente étude propose que SWI/SNF serait capable d'induire une mémoire transcriptionnelle sur le groupe de gène GAL chez la levure (Kundu *et coll.* 2007).

1.2.2.2.1.1.2 SWI/SNF et recrutement

Le recrutement de SWI/SNF sur ces promoteurs est encore mal compris au niveau global. Principalement, trois modèles ont été proposés (Figure 23):

- Dans un premier modèle, l'enzyme serait recruté en même temps que l'holo-enzyme ARN Polymérase II.
- Dans un deuxième modèle, SWI/SNF serait recruté et activé par des activateurs transcriptionnels
- Le troisième modèle est une activité catalytique dans laquelle l'enzyme vient modifier au hasard les nucléosomes. La modification persistante de ces nucléosomes serait alors suffisante pour que les facteurs de transcription interagissent avec l'ADN sous-jacent.

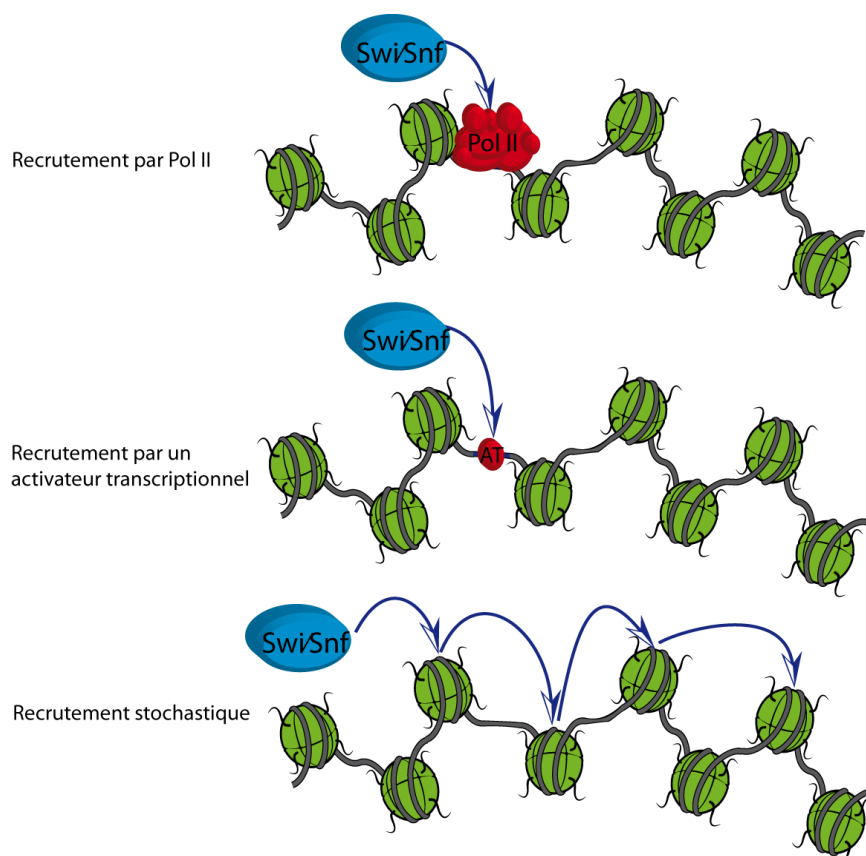


Figure 23 : Différents modèles de recrutement de SWI/SNF

Cependant, il apparaît que la réalité pourrait être intermédiaire à ces modèles : SWI/SNF peut en effet être activé par un certain nombre d'activateurs de la transcription comme les HATs mais il fonctionne parfaitement en leur absence. En outre, comme nous l'avons vu, seul certains gènes particuliers sont activés transcriptionnellement par SWI/SNF (Peterson *et coll.* 2000; Peterson *et coll.* 2000).

En dehors de ces fonctions transcriptionnelles, le complexe SWI/SNF semble également impliqué d'autres phénomènes cellulaires comme la réplication de l'ADN (Flanagan *et coll.* 1999) probablement à travers la stimulation de certains gènes mitotiques. Ces homologues humains sont quant à eux liés à bon nombre de processus de développement et de croissances tumorales (Roberts *et coll.* 2004).

1.2.2.2.1.2 RSC

RSC est un complexe d'environ 1MDa isolé chez la levure sur la base des similitudes de sa sous-unité catalytique Sth1 avec la protéine Swi2/Snf2 du complexe SWI/SNF (Cairns *et coll.* 1996). La distinction entre SWI/SNF et RSC a été fortement conservée à travers tous les eucaryotes comme chez la drosophile avec BAP et PBAP et comme chez l'homme BAF et PBAF (voir 1.2.2.2.1.2.1).

Les expériences de sensibilité à la digestion par la DNase I montre que ce complexe est capable *in vitro* de remodeler de manière ATP-dépendante la structure de la chromatine (Cairns *et coll.* 1996). Le complexe RSC est composé d'au moins 15 sous-unités (Cairns *et coll.* 1996; Sanders *et coll.* 2002). Les gènes codant treize d'entre elles sont connus. En plus de Sth1, plusieurs autres sous-unités de RSC ressemblent à des sous-unités de SWI/SNF. Les sous-unités Sth1, Sfh1, Rsc8 et Rsc6 sont homologues respectivement à Swi2/Snf2, Snf5, Swi3, et Swp73. Les deux complexes partagent également deux protéines apparentées à l'actine, Arp7 et Arp9 (aussi nommées Rsc11/Swp61 et Rsc12/Swp59). Ces deux protéines, bien que capables d'hydrolyser l'ATP, semblent avoir un rôle plus structural que catalytique (Peterson *et coll.* 1998). Par ailleurs, le complexe RSC compte au moins 6 sous-unités spécifiques : Rsc1, Rsc2, Rsc3, Rsc4, Rsc30 et Rsc58.

Malgré leur ressemblance, les complexes SWI/SNF et RSC ne sont pas redondants. En effet, contrairement à SWI/SNF, le complexe RSC est essentiel à la mitose. D'autre part, l'estimation des rendements de purification suggère que RSC est au moins dix fois plus abondant dans la cellule que SWI/SNF. Ceci permet d'émettre l'hypothèse que RSC pourrait soit agir au niveau de nombreux promoteurs soit être impliqué dans plusieurs autres processus agissant au niveau de l'ADN comme la réparation ou la réplication de l'ADN.

Le complexe RSC existe sous plusieurs isoformes. La purification du complexe à partir d'anticorps dirigés contre la sous-unité Rsc6 fait apparaître deux formes distinctes de RSC. La forme RSCa est dépourvue des polypeptides Rsc3 et Rsc30 et représente 10 à 20 % de la quantité de complexes purifiés (Cairns *et coll.* 1996; Angus-Hill *et coll.* 2001). Les complexes RSC et RSCa ont des propriétés extrêmement proches (Cairns *et coll.* 1996). Par ailleurs, il existe aussi deux autres isoformes de RSC qui contiennent soit la protéine Rsc1 soit la protéine Rsc2. L'isoforme contenant la protéine Rsc2 est la plus abondante. Les protéines Rsc1 et Rsc2 sont fortement similaires et ne sont pas essentielles. Toutefois, la délétion des gènes *RSC1* ou *RSC2* confère des défauts de croissance spécifiques. La délétion simultanée des deux gènes est par contre létale (Cairns *et coll.* 1999). Les protéines Rsc1 et Rsc2 partagent donc des fonctions communes mais ne sont pas totalement redondantes et interchangeables. Chacune contient deux bromodomains (III.1) et un domaine de type BAH. Ce dernier est un motif protéique d'environ 130 résidus qui a été originellement identifié dans

les protéines Polybromo humaine et Rsc2 de levure (Nicolas *et coll.* 1996). La présence dans ces deux protéines de bromodomaines a conduit à nommer ce motif "**B**romodomain **A**djacent **H**omology". Le motif BAH, retrouvé chez tous les eucaryotes, est présent dans un grand nombre de protéines qui possèdent par ailleurs soit un domaine impliqué dans la régulation transcriptionnelle soit des motifs de liaison à l'ADN. Ceci suggère un rôle dans la régulation de la transcription (pour revue, voir (Callebaut *et coll.* 1999)). Les protéines Rsc1, Rsc2 et Polybromo sont toutefois les seuls polypeptides connus possédant à la fois des bromodomaines et des motifs BAH (Goodwin *et coll.* 2001). Il a été proposé que ce motif soit un module d'interaction protéine-protéine impliqué dans la régulation transcriptionnelle (Callebaut *et coll.* 1999). Notons également que les protéines Rsc1 et Rsc2 contiennent aussi un crochet AT (AT-hook).

Des expériences d'immunoprécipitation de chromatine ont été réalisées sur les deux isoformes du complexe. Elles ne font pas apparaître de différences flagrantes dans la localisation des complexes contenant les protéines Rsc1 ou Rsc2 (Ng *et coll.* 2002). La non-redondance de Rsc1 et Rsc2 suggère alors que les deux complexes agissent différemment au niveau de quelques loci et/ou qu'ils assurent des fonctions spécifiques autres que transcriptionnelles.

1.2.2.2.1.2.1 RSC humain

Les cellules de mammifères contiennent deux ATPases de type Swi2/Snf2, Brg1 et Brm. Trois complexes humains ont été purifiés à partir de deux fractions chromatographiques distinctes de cellules HeLa (Wang *et coll.* 1996; Wang *et coll.* 1996). La première fraction contient deux complexes très proches qui ont comme sous-unité ATPase respective les protéines Brg1 et hBrm. Ces deux complexes ont des propriétés biochimiques voisines et sont tous les deux nommés SWI/SNF-A ou BAF (**B**rg1 **A**ssociated **F**actor). Ces complexes ont, en dehors de l'ATPase, des compositions similaires. La deuxième fraction ne comporte qu'un seul complexe, SWI/SNF-B ou PBAF (**P**oly**B**romo **A**ssociated **F**actor), dont l'ATPase est Brg1 (Xue *et coll.* 2000). Les formes A et B contiennent chacune des sous-unités spécifiques.

La protéine Baf250 n'est présente que dans les complexes de la forme A. Les polypeptides Baf180, Baf200 et Baf240 sont quant à eux caractéristiques du complexe SWI/SNF-B (Xue *et coll.* 2000). La protéine Baf180 a la particularité de posséder 6 bromodomaines, deux motifs BAH ainsi qu'un module HMG (*High Mobility Group*). Les protéines de drosophile CG11375 et de *C. elegans* CE05310 ont des organisations similaires à celle de Baf 180. Par contre, aucune protéine de levure ne possède ces 9 motifs. Chez *S. cerevisiae*, les protéines les plus ressemblantes sont les sous-unités Rsc1, Rsc2 et Rsc4 du complexe RSC (Xue *et coll.* 2000). Il a été proposé que la protéine Baf180 résulte d'une fusion de ces trois protéines au cours de l'évolution (Xue *et coll.* 2000). Le complexe SWI/SNF-B serait donc l'homologue humain de RSC. Bien qu'elles présentent 75% d'identité, les ATPases Brg1 et Brm ne semblent pas avoir les mêmes rôles biologiques. L'inactivation du gène *BRM* chez la souris est viable. Cette inactivation s'accompagne d'une augmentation de l'expression de la protéine Brg1, ce qui évoque un mécanisme de compensation entre les deux formes de complexes SWI/SNF-A qui permettrait de pallier l'absence de l'ATPase Brm. Toutefois, les cellules *brm* *-/-* présentent des défauts de contrôle du cycle cellulaire. Ces cellules perdent l'inhibition de contact *in vitro* et les souris *brm* *-/-* sont prédisposées au développement de tumeurs. Contrairement au gène *BRM*, l'inactivation du gène *BRG1* induit une létalité embryonnaire. Cette létalité rappelle le caractère essentiel du complexe RSC.

Le complexe SWI/SNF-B ne contient que l'ATPase Brg1. L'effet délétère de la délétion du gène *BRG1* suggère que les deux ATPases Brm et Brg1 ne sont pas

interchangeables au sein du complexe SWI/SNF-B et que les trois complexes SWI/SNF ne sont pas redondants. Toutefois, l'inactivation du gène *BGR1* est possible dans certains types cellulaires, ce qui indique que sa fonction n'est pas requise de manière absolue dans tous les types cellulaires (pour revue, voir (Muchardt *et coll.* 2001)).

1.2.2.2.1.2.2 RSC et transcription

Le complexe RSC est impliqué dans le contrôle de la transcription. Il faut noter que, par opposition à ce qui a été rapporté pour les complexes SWI/SNF humains et de levure, le complexe RSC n'a pas été co-purifié avec l'ARN polymérase II de levure (Cairns *et coll.* 1996; Wilson *et coll.* 1996; Neish *et coll.* 1998). Le mutant *nps1-105* (mutant de la sous-unité catalytique Sth1) est affecté dans le processus de sporulation. Ce mutant présente un taux de sporulation réduit et un délai dans le déclenchement de la méiose. Ce phénotype s'accompagne de défauts transcriptionnels pour les gènes *IME2*, *SPO11* et *SPO13*, induits en tout début de méiose. Moreira et Holmberg ont montré que RSC est impliqué dans le contrôle de la transcription du gène *CHA1* (Moreira *et coll.* 1999). Ce gène est fortement induit lorsque les cellules sont cultivées en présence de sérine dans le milieu. Lorsque les protéines Sth1 ou Rsc8 sont déplétées, l'expression du gène *CHA1* dans des cellules non induites est comparable à celle des cellules induites. Ceci suggère que la répression de la transcription du gène n'a plus lieu.

Ces changements transcriptionnels sont corrélés avec des perturbations de la structure chromatinienne du promoteur. En condition standard, un nucléosome est placé sur la boîte TATA. L'induction de la transcription du gène s'accompagne d'un déplacement de ce nucléosome. Lorsque les protéines Sth1 ou Rsc8 sont déplétées, ce déplacement est observé quelles que soient les conditions de croissance. Le remodelage du promoteur effectué par le complexe RSC est donc requis pour la répression de la transcription du gène *CHA1*. Ceci montre de plus que le complexe RSC peut avoir un effet négatif sur la transcription. Des études du transcriptome sur des mutants de *RSC3*, *RSC30* et *RSC9* suggèrent qu'il existe une spécialisation des sous-unités au sein du complexe. Les ensembles de gènes affectés dans ces différents mutants ne sont pas entièrement identiques, ce qui suggère que certaines sous-unités sont responsables du ciblage de l'activité de remodelage de RSC au niveau de certains gènes. La localisation du complexe RSC au niveau des régions intergéniques a été analysée par la technique d'immunoprécipitation de chromatine combinée à une hybridation sur puces à ADN à partir de plusieurs sous-unités du complexe (Damelin *et coll.* 2002; Ng *et coll.* 2002). L'immunoprécipitation de chromatine permet de déterminer quels sont les fragments d'ADN auxquels une protéine se fixe. Les résultats des deux études sur RSC sont en partie divergents. Les auteurs ont souligné la difficulté de ponter le complexe RSC à l'ADN. Cette difficulté pourrait expliquer les divergences entre les deux études. D'autre part, cela entraîne une certaine incertitude sur les cibles de RSC. Néanmoins, ces études indiquent que RSC est impliqué dans la transcription de gènes codant des protéines ribosomiques, des protéines impliquées dans l'utilisation des différentes sources d'azote, de réponse aux stress, dans le maintien de la paroi cellulaire, ainsi que de plusieurs gènes liés au cycle cellulaire. Ces résultats concordent avec les résultats d'analyse du transcriptome de mutant de *rsc3* et *rsc30*. D'autre part, la localisation de Rsc9 change en réponse à différents stress. Cela indique que RSC est ciblé vers différents gènes en fonction des conditions de culture.

L'étude menée par Ng *et coll.* révèle également que RSC occupe de manière privilégiée les régions situées en amont des gènes transcrits par l'ARN polymérase III (Ng *et coll.* 2002). Le complexe RSC aurait la particularité de participer à la transcription par l'ARN polymérase II et l'ARN polymérase III. En revanche, aucune occupation du promoteur de l'ADN ribosomique n'a été constatée.

1.2.2.2.1.2.3 RSC et cycle cellulaire

Des études suggèrent une implication du complexe RSC dans le cycle cellulaire. Différents mutants des sous-unités Rsc1, Rsc2, Rsc9, Rsc3, Rsc30, Sth1 sont bloqués à la transition G2/M (Cao *et coll.* 1997; Du *et coll.* 1998; Tsuchiya *et coll.* 1998; Cairns *et coll.* 1999; Angus-Hill *et coll.* 2001; Damelin *et coll.* 2002). Ce blocage est dû à l'activation d'un "point de contrôle" du fuseau mitotique (généralement activé par un mauvais accrochage d'un chromosome aux microtubules ou suite à des dommages du fuseau mitotique). Les mutants *nps1-105* et *sth1-3ts* sont sensibles aux drogues déstabilisant les microtubules (Tsuchiya *et coll.* 1998; Chai *et coll.* 2002). Dans le mutant *nps1-105*, la structure chromatinienne autour du centromère est perturbée. Ce changement est détecté par une modification du profil de digestion des régions centromériques par des nucléases et des enzymes de restriction. Cette altération n'est apparemment pas due à une perte de nucléosomes dans les régions centromériques (Tsuchiya *et coll.* 1998). Par ailleurs, une étude récente a montré l'existence d'interactions physiques et génétiques entre RSC et des composants du kinétochore (Hsu *et coll.* 2003). Le complexe RSC a été localisé par immunoprécipitation de chromatine au niveau des centromères et joue un rôle dans la séparation des chromosomes mitotiques (Hsu *et coll.* 2003; Huang *et coll.* 2004). D'autre part, l'homologue humain de RSC, SWI/SNF-B, est localisé au niveau des kinétochores (Xue *et coll.* 2000). Ces données indiquent que le complexe RSC intervient dans le déroulement du cycle cellulaire. Cette fonction pourrait être directe par exemple sur la ségrégation des chromosomes et la structure du centromère et indirecte *via* la régulation de la transcription de gène contrôlant le cycle cellulaire.

1.2.2.2.2 ISWI

La famille ISWI est caractérisée par la protéine de Iswi (**I**mitation **S**WI), isolée chez la drosophile. Cette protéine présente de forte similitude avec Swi2/Snf2 mais contient un motif de type SANT à la place du bromodomaine présent dans la protéine Swi2. Le motif SANT est un motif de liaison à l'ADN fréquemment trouvé dans des protéines liées à la chromatine (revue dans (Aasland *et coll.* 1996)). Le premier membre de cette famille est le complexe de drosophile NURF (**N**ucleosome **R**emodeling **F**actor). En plus de NURF, la famille ISWI contient entre autres les complexes de drosophile CHRAC (**C**Hromatin **R**emodeling and **A**ssembly **C**omplex) et ACF (**A**TP-utilizing **C**hromatin remodeling and assembly **F**actor), de levure ISW1a/b et ISW2, humains RSF (**R**emodeling and **S**spacing **F**actor), WCRF (**W**illiams syndrome transcription factor **C**hromatin **R**emodeling **F**actor), CHRAC et NoRC (**N**ucleolar **R**emodeling **C**omplex ; pour revue (Langst *et coll.* 2001)).

Il est intéressant de noter la présence de la même ATPase dans plusieurs complexes de compositions différentes. Les protéines de levure Isw1 et Isw2 sont homologues. Ce sont les sous-unités ATPase respectivement des complexes ISW1a/b et ISW2 dont les fonctions sont différentes. En effet, des études indiquent que les complexes CHRAC, ACF, ISW1a et ISW2 peuvent moduler l'espacement des nucléosomes *in vitro* et produire une chromatine pour lequel l'espacement entre nucléosomes est régulier (Tsukiyama *et coll.* 1997; Varga-Weisz *et coll.* 1997) alors que les facteurs NURF et ISW1b ne le peuvent pas. Dans le cas de ISW2 et ISW1a, il a été postulé que cette capacité de régularisation était liée à la nécessité pour ces derniers de se lier à la fois au nucléosome et à l'ADN présent à l'extérieur du nucléosome (Dang *et coll.* 2007; Dang *et coll.* 2007; Gangaraju *et coll.* 2007). Par ailleurs, la protéine Iswi, produite de manière recombinante, possède une activité intrinsèque de remodelage *in vitro*, la protéine Iswi peut assembler des nucléosomes et catalyser le transfert d'un nucléosome du centre de la matrice vers son extrémité. Au sein de CHRAC, Iswi catalyse la réaction inverse en transférant les nucléosomes préférentiellement des extrémités vers le

centre de la matrice (Langst *et coll.* 1999). Il a été démontré que la protéine Acf1 fait partie des complexes ACF et CHRAC. L'association des protéines Iswi et Acf1 a pour conséquence non seulement d'augmenter très fortement l'activité d'Iswi mais également de modifier ces propriétés intrinsèques de remodelage (Ito *et coll.* 1999; Eberharter *et coll.* 2001). En particulier en présence de la chaperonne d'histone NAP1, ACF est capable d'assembler la chromatine sous la forme d'un chapelet régulier dans lequel les nucléosomes sont séparés de 50 pb (Gemmen *et coll.* 2005). Ces données montrent donc que bien que tous ces complexes possèdent l'ATPase Iswi, leurs activités sont différentes et que l'activité d'Iswi est modulée par les autres protéines auxquelles elle s'associe. Une même ATPase peut donc catalyser des réactions différentes en fonction de la composition du complexe au sein duquel elle s'intègre.

In vivo, il a été montré par immunoprécipitation de la chromatine et en utilisant un mutant non catalytique de ISW2 (Gelbart *et coll.* 2005) que la présence de ce moteur au niveau de certains promoteurs conduisait au déplacement directionnel de quelques nucléosomes et que son absence favorisait l'initiation de la transcription aux sites cryptiques (Whitehouse *et coll.* 2007). En outre, à la manière de ce que semblent indiquer les données obtenues pour les moteurs de la sous-famille swi2/snf2 (voir 1.2.2.2.1.1.2) il a été montré que ISW2 peut fonctionner selon deux modes distincts : l'un où le moteur remodèle non spécifiquement à un niveau basal tous les nucléosomes et un autre où son action est ciblée à un promoteur donné est pour lequel la partie basique de la queue de H4 et des facteurs additionnels sont nécessaires (Fazzio *et coll.* 2005)

Le complexe de mammifères NoRC (**N**ucleo**O**lar **R**emodeling **C**omplex) semble être un autre membre de la famille ISWI (Strohner *et coll.* 2001). La protéine Tip5 interagit avec hSnf2h, l'homologue humain de Iswi. Des expériences d'immunofluorescence montre que Tip5 est localisé dans le nucléole. Le complexe Tip5-Snf2h est capable *in vitro* de faire glisser des nucléosomes de manière ATP-dépendante (Strohner *et coll.* 2001). NoRC semble être un complexe de remodelage nucléolaire impliqué dans la régulation de la structure chromatinienne du locus de l'ADN ribosomique (Li *et coll.* 2006).

1.2.2.2.3 INO80

La protéine Ino80 représente un type d'ATPase différent. En effet, son domaine ATPase est constitué de deux sous-domaines. L'aptitude du complexe INO80 à remodeler la structure de la chromatine a été démontrée *in vitro* (Shen *et coll.* 2000). Du point de vue transcriptionnel, le gène *INO80* a été isolé parce qu'il est nécessaire à la transcription du gène *INO1* en l'absence d'inositol (Ebbert *et coll.* 1999). Le complexe INO80 pourrait également intervenir dans la réparation de l'ADN. En effet, la protéine bactérienne RuvB est impliquée dans la réparation de l'ADN. La protéine Ino80 est co-purifiée avec deux protéines homologues à cette ADN hélicase, Rvb1 et Rvb2. Cela pourrait expliquer l'activité ADN hélicase associée au complexe INO80 (Shen *et coll.* 2000). Une mutation dans le gène *INO80* entraîne une sensibilité accrue aux dommages à l'ADN (Shen *et coll.* 2000), ce qui suggère que le complexe INO80 pourrait participer aux mécanismes de réparation des dommages à l'ADN.

1.2.2.2.4 Mi2/CHD

L'ATPase fondatrice de cette famille est la protéine humaine Mi-2 (Zhang *et coll.* 1998; Wade *et coll.* 1999). Cette protéine possède un chromodomaine et appartient au complexe NuRD (**N**ucleosome **R**emodeling and **D**eacetylating ; (Tong *et coll.* 1998; Xue *et coll.* 1998). Comme cela a été observé pour d'autres complexes de remodelage, l'activité de l'ATPase est modulée par les autres protéines du complexe (Wang *et coll.* 2001). Notons que ce complexe a

la particularité de posséder une activité de remodelage de la chromatine jumelée à une activité d'histone déacétylase. En effet, ce complexe contient les histones déacétylases Hdac1 et Hdac2. La fonction des complexes de cette famille est encore mal comprise. Les complexes isolés de cellules de mammifères et de xénope contiennent aussi des ADN méthyltransférases putatives (Wade *et coll.* 1999; Zhang *et coll.* 1999). La présence d'histone déacétylases et d'ADN méthyltransférases dans ces complexes suggère qu'ils sont impliqués dans la répression transcriptionnelle. Toutefois, la protéine Chd1, un homologue de Mi-2 chez la drosophile, est localisée au niveau de la chromatine transcriptionnellement active, ce qui évoque un rôle positif dans la transcription pour cette protéine (Stokes *et coll.* 1996). Chez *S. cerevisiae*, seul le polypeptide Chd1 appartient à la famille de protéines Mi-2. Il a été montré par puces à ADN, que Chd1 n'est requise pour la transcription que d'un petit nombre de gènes (Tran *et coll.* 2000). Il est possible que l'activité de Chd1 soit partiellement redondante avec d'autres complexes de remodelage déjà identifiés ou non. Par ailleurs, alors que les protéines de type Mi-2 des eucaryotes supérieurs sont assemblées dans des complexes et associées à des histone déacétylases, la protéine Chd1 de levure forme apparemment un homodimère. Aucune interaction physique ou génétique de Chd1 avec des histone déacétylases n'a été décrite à ce jour.

1.2.3 Conclusion sur les facteurs de remodelage

Nous avons vu dans cette partie les différentes voies épigénétiques qui modulent l'accessibilité à l'ADN chromatinien. Chacune d'entre elles permet de modifier de manière sélective certaines propriétés de la chromatine. Dans le cas du recrutement des facteurs de remodelage la grande variété des complexes et leur spécialisation fonctionnelle suggèrent l'importance de ce type de processus. Nous allons maintenant nous intéresser au mécanisme de cette action et plus généralement à l'étude des mécanismes d'une plus grande classe de complexes ATPase : les moteurs moléculaires.

1.3 Les techniques de molécules uniques et leur application à l'étude des moteurs moléculaires

1.3.1 Les expériences de molécules uniques sur les moteurs moléculaires

Pour réaliser des processus aussi divers que les mouvements cellulaires, le déplacement d'organelle (Asbury 2005), la transformation d'un gradient de concentration en ions en mouvement rotatif et en synthèse d'ATP (Kinosita *et coll.* 2004), le translocation d'ADN (Saleh *et coll.* 2004), le repliement ou le dépliement de protéines (Rapoport 2007), la transcription de l'ADN (Erie *et coll.* 1992), la cellule possède des structures moléculaires adaptées qui se comportent comme des nano-machines spécialisées. Ces assemblages moléculaires doivent utiliser une source d'énergie extérieure pour produire ces mouvements, elles se comportent ainsi comme de véritables moteurs moléculaires convertissant une énergie chimique en travail mécanique (Julicher *et coll.* 1997; Bustamante *et coll.* 2004; Greenleaf *et coll.* 2007).

Les myosines, kinésines et dynéines forment, par exemple, un ensemble de familles de moteurs moléculaires parmi les mieux caractérisés. Leur fonction est de se déplacer le long du

cytosquelette (microtubules ou filaments d'actine) en utilisant l'énergie produite par l'hydrolyse de l'ATP. Ce mouvement est utilisé selon le cas dans le transport de vésicules, le mouvement ciliaire ou encore la contraction musculaire (Barany 1967; Asbury 2005). Bien d'autres enzymes comme celles se fixant à l'ADN ou l'ARN sont des moteurs moléculaires. Les hélicases permettent ainsi, en utilisant l'hydrolyse de l'ATP, d'ouvrir l'ADN pour séparer ses deux brins complémentaires (Lohman *et coll.* 1996). Les topoisomérases II sont quant à elle capables de désenchevêtrer l'ADN en faisant passer un double brin d'ADN au travers d'un autre (Champoux 2001). Nombres d'autres protéines peuvent, elles, transloquer l'ADN (Saleh *et coll.* 2004) ou compacter l'ADN viral au sein de la capsid (Smith *et coll.* 2001). Les ADN et ARN polymérases peuvent répliquer ou transcrire l'ADN (Kasas *et coll.* 1997; Wang *et coll.* 1998; Dalal *et coll.* 2006; Herbert *et coll.* 2006). L'ATP synthase utilise le potentiel électrochimique créé par un gradient trans-membranaire de protons pour générer un couple de rotation et de l'ATP (Noji *et coll.* 1997). Nous présentons comme exemple de cycle catalytique celui de l'ATP synthase (Figure 24)

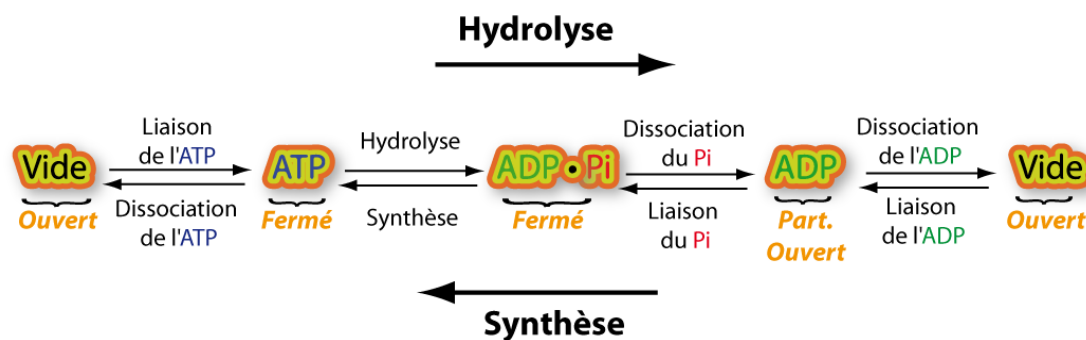


Figure 24 : Exemple de cycle catalytique : l'ATP synthase

Pour exemple, le cycle catalytique de l'ATP synthase mis à jour par les expériences de Kinosita *et coll.* (Adachi *et coll.* 2007) est représenté au niveau du site de fixation de l'ATP. On remarque deux configurations de cette poche 'ouverte' ou 'fermée' dont l'ouverture partielle ou totale correspond à la dissociation du phosphate inorganique puis de l'ADP.

De nombreuses approches ont déjà été utilisées pour étudier les moteurs moléculaires. Des études structurales (Rayment *et coll.* 1993; Abrahams *et coll.* 1994; Hirose *et coll.* 1996; Kull *et coll.* 1996) ont fourni des informations détaillées sur les conformations possibles de ces moteurs mais ces images restent statiques. Des études biochimiques (Hackney 1988; Ingold 1988; Futai *et coll.* 1989; Scholey *et coll.* 1989; Yang *et coll.* 1990) détaillées de mobilité et de cinétiques ont fourni une image plus dynamique mais impliquent des mesures moyennes sur un très grand nombre de molécules. Du fait que les populations moléculaires sont souvent hétérogènes les propriétés d'ensemble déterminées par ces études ne sont pas toujours représentatives des molécules individuelles.

Le récent développement de techniques dites de molécules uniques a permis d'étudier individuellement ces objets pour extraire des paramètres intrinsèques comme le rendement énergétique (Kinosita *et coll.* 2000), la force d'arrêt (Wang *et coll.* 1998; Visscher *et coll.* 1999) ou le pas du moteur (Svoboda *et coll.* 1993; Shaevitz *et coll.* 2003; Fehr *et coll.* 2008) inaccessibles précédemment. Ce type d'outil est en outre particulièrement adapté à l'étude des mécanismes puisqu'il permet d'accéder non seulement aux valeurs moyennes de paramètres mais aussi à leur distribution. Ceci permet une comparaison quantitative avec les modélisations effectives de ces phénomènes. Sans rentrer dans les détails nous verrons comment ces techniques ont permis d'étudier de manière dynamique et directe le mécanisme des moteurs moléculaires. Ceci nous permettra d'introduire ces techniques ainsi que le type

d'approche que nous avons utilisé dans les expériences exposées dans la partie résultat (chapitres 3 à 6).

ENCART : *Quelques paramètres dynamiques importants des moteurs moléculaires*

La processivité : Physiquement c'est la distance parcourue par le moteur sur son substrat avant de se dissocier. Elle diffère du temps de liaison car elle rend compte aussi de l'efficacité du déplacement. Ex : kinésine 1 : $L_{proc} = 1.7 \mu\text{m}$. On peut aussi la définir comme la probabilité de faire un nouveau pas.

La stochasticité : Elle quantifie le caractère aléatoire du mouvement. On la calcule comme un nombre sans dimension $r = 2D/Vd$ où D est la dispersion, V la vitesse moyenne et d la longueur d'un pas. Elle vérifie l'inégalité $r \leq 1/N$. Elle a été utilisée pour déterminer le nombre d'étapes dans le cycle catalytique ou le nombre de molécules d'ATP utilisées par cycle catalytique. Ex : kinésine : $r \sim 0.39$ (Kolomeisky *et coll.* 2007).

La relation force-vitesse : Elle rend compte de la sensibilité du moteur à une force contraire au déplacement de ce dernier. Elle permet donc de quantifier l'effet de la force sur l'étape cinétiquement limitante ou de mettre en avant les étapes dépendantes d'une force. Ex : en absence de force la kinésine avance à $0.8 \mu\text{m/s}$ soit 100 pas par seconde, cette vitesse décroît avec la force qui s'oppose au déplacement et la force d'arrêt est de $\sim 7 \text{ pN}$ (Visscher *et coll.* 1999).

Distribution des temps d'attente : pour les moteurs moléculaires comme l'ARN-polymérase il a été montré la présence de temps d'attente entre chaque pas. Ceci permet en particulier de caractériser le nombre molécule d'ATP consommé pour chaque événement.(Shaevitz *et coll.* 2005).

1.3.1.1 Méthodes passives / suivi

1.3.1.1.1 Vidéo microscopie et suivi de particule

Les moteurs moléculaires du cytosquelette (kinésines et myosines) produisent un mouvement directionnel. La méthode la plus directe pour étudier ce phénomène est donc de marquer les moteurs à l'aide d'un label comme une petite particule colloïdale ou une molécule fluorescente et de suivre le déplacement de ce label par microscopie optique. Dans le cas des fluorophores, la résolution obtenue avec ce type de technique de 1 à 2 nm en utilisant des méthodes d'interpolation du type FIONA (Yildiz *et coll.* 2005).

Cette technique a permis de montrer que le mécanisme de déplacement de ces moteurs à 2 « pieds » était du type « hand over hand » ce qui veut dire que chaque pied avance alternativement et que le pied le plus avancé est dépassé à chaque pas par le pied qui le précède. Pour ce faire, Selvin *et coll.* ont marqué séparément chacun des pieds et ont montré que chaque pied du moteur possède un pas caractéristique (72 nm pour la myosine, 16 nm pour la kinésine) qui est le double de celui observé lorsque l'on marque le centre de masse du moteur entier (Yildiz *et coll.* 2004; Yildiz *et coll.* 2004).

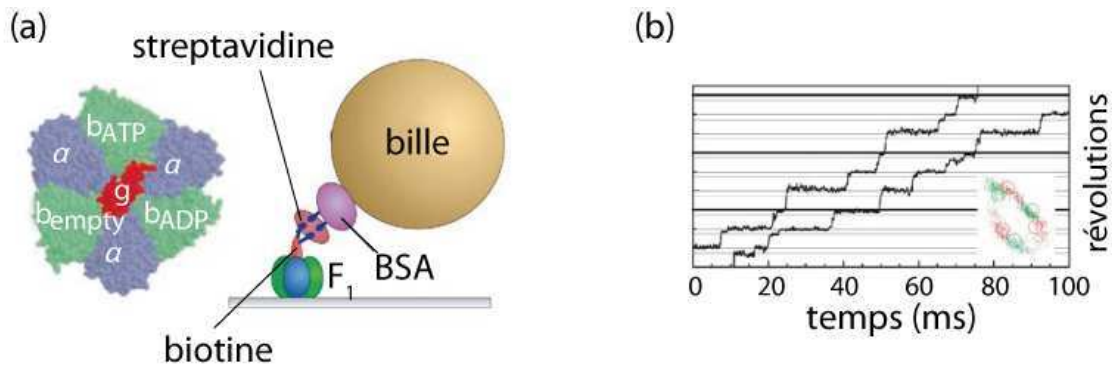


Figure 25 : Suivre de particule et F1F0-ATPase

(a) Principe de l'expérience de marquage de la F1F0 ATPase par une bille d'or (b) Evolutions temporelle de la position angulaire de la bille au cours de l'expérience. On remarque la forme en escalier de ce signal qui est caractéristique d'un moteur moléculaire en présence d'une concentration limitante en ATP (ici [ATP] = 2 μ M). D'après (Yasuda *et coll.* 2001).

Dans le cas d'un moteur effectuant une rotation comme l'ATP synthase, il a été montré qu'elle réalise un mouvement discret dont le pas caractéristique est de 120° (Yasuda *et coll.* 1998). Pour ce faire Kinosita *et coll.* ont attaché un filament d'actine de ~1 μ m de long sur la partie en rotation du moteur (le rotor) et ont suivi le mouvement de ce dernier. Par la suite, en remplaçant ce long filament par une particule d'or de 40 nm dont la force de trainée est plus faible (Figure 25), ils ont pu montrer que ce pas était en fait composé d'un pas de 90° associé à la liaison de l'ATP et d'un autre pas de 30° lié à la dissociation de l'ADP (Yasuda *et coll.* 2001). Ces études directes ont enfin permis de mesurer le rendement énergétique de ce moteur qui est proche de 100% (Kinosita *et coll.* 2000).

Pour étudier des changements internes de configurations ou des réarrangements plus rapides (< 1 ms) la technique de transfert d'énergie entre molécules fluorescentes (FRET) a été utilisée.

1.3.1.1.2 FRET

Le FRET (pour Fluorescence/Föster Resonance Energy Transfer) permet de mesurer des mouvements nanométriques par le couplage résonant de deux fluorophores différents attachés en deux points de la molécule d'intérêt. Un des fluorophores, le donneur, est excité par une source externe et transfère de manière non radiative son énergie (par interaction dipôle-dipôle de type Föster) au second fluorophore (l'accepteur) dont le spectre d'adsorption chevauche le spectre d'émission du donneur. L'efficacité E de transfert varie comme :

$$E = \frac{1}{1 + \left(\frac{R}{R_0}\right)^6}$$

où R la distance donneur-accepteur et R_0 est le Rayon de Föster, pouvant varier de 2 à 6 nm.

Cette technique permet de suivre des déplacements de 1 à 10 nm environ. Néanmoins du fait de la dépendance du rayon de Föster avec les orientations relatives de chacun des fluorophores une interprétation de l'efficacité de transfert en terme de distances reste en général qualitative.

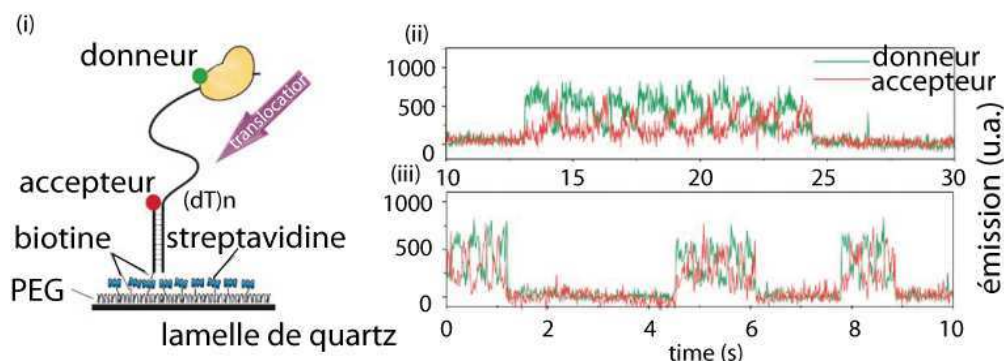


Figure 26 : Etude par FRET de l'hélicase Srs2

(i) Principe de l'expérience de FRET réalisé sur Srs2. (ii) Evolution temporelle des signaux de fluorescence (en vert le donneur et en rouge l'accepteur). On remarque deux régimes : l'un où les deux signaux sont nuls correspondant à l'absence de l'enzyme et l'autre où les courbes vertes et rouges sont complémentaires (phénomène de transfert d'énergie). Le caractère oscillatoire du signal suggère le mouvement de va et vient de l'hélicase sur l'ADN. Adapté de (Myong *et coll.* 2005)

Ce type de méthode a, par exemple, permis de mettre en évidence le mouvement de navette réalisé par l'hélicases Srs2 sur un ADN simple brin entre les fourches de réplication (Figure 26). Ce mouvement rapide a été interprété comme un moyen d'empêcher les phénomènes de recombinaisons à la suite de l'ouverture du double brin pendant la réplication (Myong *et coll.* 2005). En outre, il a été montré que lors l'initiation de la transcription l'ADN en aval de l'ARN polymérase était poussée à l'intérieur du complexe pour former l'intermédiaire réactionnel localement dénaturé (Kapanidis *et coll.* 2006).

1.3.1.2 Méthodes actives / application d'une force

L'intérêt apporté par l'application d'une force aux molécules à étudier est principalement qu'elle permet de visiter et de modifier le paysage énergétique du moteur.

1.3.1.2.1 Pinces optiques

La méthode de molécule unique la plus utilisée aujourd'hui est le système de pinces optiques. Dans cette méthode, un laser focalisé exerce une pression radiative sur une particule diélectrique colloïdale à laquelle la molécule d'intérêt est attachée. L'autre extrémité de la molécule est liée à un autre piège optique ou à une surface fixe (Figure 27). Le fort gradient électromagnétique présent au point de focalisation polarise la particule diélectrique subit une force proportionnelle à ce gradient et la piège. Le faisceau agit donc comme une pincette exerçant une force de rappel élastique à partir du centre du piège. La force appliquée par ce ressort optique peut être ajustée en modulant l'intensité du faisceau laser.

Cette technique a permis l'étude de nombreux moteurs. L'action mécanique des moteurs du cytosquelette comme la kinésine (Block *et coll.* 1990; Svoboda *et coll.* 1993; Svoboda *et coll.* 1994; Schnitzer *et coll.* 1997; Visscher *et coll.* 1999; Schnitzer *et coll.* 2000; Fehr *et coll.* 2008), la myosine (Finer *et coll.* 1994; Molloy *et coll.* 1995; Rock *et coll.* 2001; Altman *et coll.* 2004) et la dynéine (Mallik *et coll.* 2004; Toba *et coll.* 2006) a par exemple était caractérisée en détail.

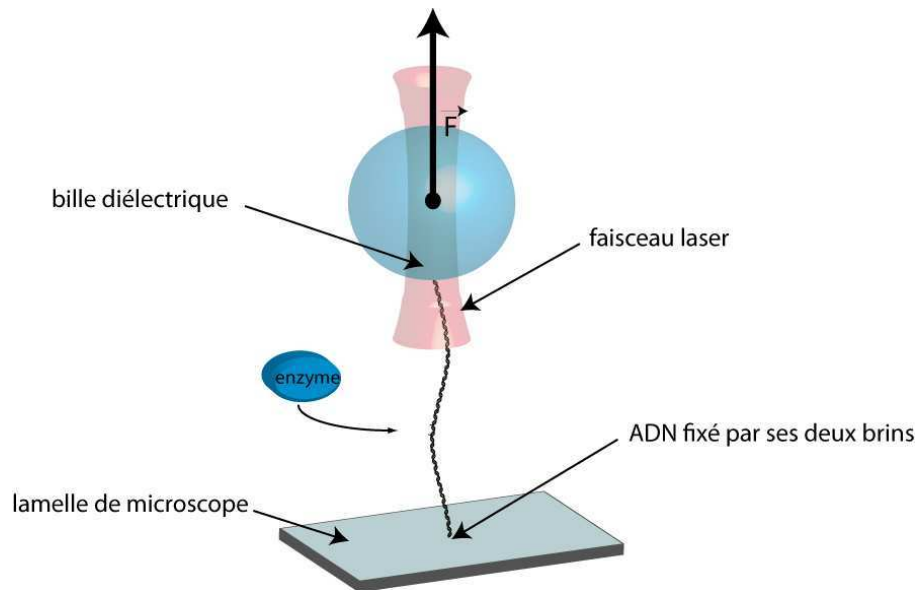


Figure 27 : Principe d'un montage de pinces optiques

Un faisceau laser focalisé par un objectif de microscope permet de piéger un colloïde diélectrique de taille micrométrique. A l'aide de cette pincette optique on peut manipuler la bille (ici liée à un ADN fixé à son autre extrémité sur une lamelle de microscope) mais également mesurer la force exercée sur cette bille par exemple par l'action d'une enzyme sur l'ADN.

Les pinces optiques ont été utilisées de la même manière pour étudier des moteurs liés aux acides nucléiques comme les exonucléases ou les hélicases (Perkins *et coll.* 2003; Perkins *et coll.* 2004; Dumont *et coll.* 2006). En ce qui concerne la compaction de l'ADN viral dans le bactériophage $\Phi 29$, il a été montré que le moteur responsable de l'injection de l'ADN viral dans la capsid du phage était capable de pousser l'ADN même lorsqu'on lui applique des forces importantes. Les résultats de ces expériences ont permis aux auteurs de proposer un modèle cinétique minimal (Smith *et coll.* 2001).

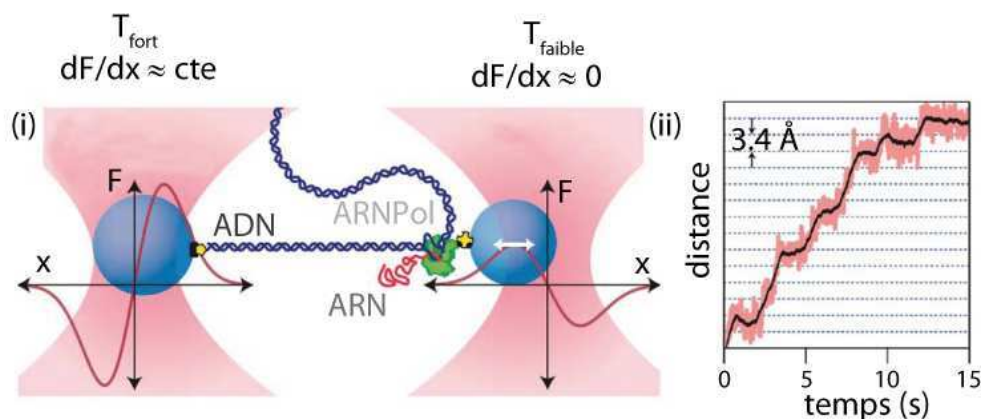


Figure 28 : Pinces optiques et transcription

(à gauche) principe de l'expérience de contrôle de l'activité de l'ARN polymérase à l'aide de deux pinces optiques. Le premier faisceau piège fortement la bille accrochée à l'ADN (i) alors que le deuxième moins puissant contraint faiblement la bille accrochée à l'enzyme. (à droite) Ceci permet de d'appliquer une force constante lors de l'activité de l'ARN polymérase et de mesurer les arrêts dans son avancée qui sont ici d'une paire de base soit 3.4 Å.

Dans le cas de l'ARN Polymérase (Figure 28), Block *et coll.* ont montré que les fréquentes pauses observées au cours de l'élongation (Wuite *et coll.* 2000; Neuman *et coll.* 2003) se trouvaient hors du chemin cinétique du moteur, dépendaient de la séquence (Herbert *et coll.* 2006) mais n'étaient pas liées à la structure secondaire de l'ARN transcrit (Herbert *et coll.* 2006). Des mesures à haute résolution ont également montré que le pas de son déplacement était bien de 3.4 Angstrom (Abbondanzieri *et coll.* 2005) soit une paire de base contraignant ainsi fortement les possibles modèles de couplage mécano-chimiques.

1.3.1.2.2 Pinces magnétiques

En utilisant également une bille liée à la molécule à étudier, cette technique est basée sur la force magnétique d'un aimant pour contraindre la position d'une particule superparamagnétique (Figure 29). Le principal avantage de cette méthode est qu'elle permet d'appliquer un couple de torsion aux molécules à étudier. Cette méthode a été appliquée, elle aussi, à l'étude de nombreux moteurs moléculaires.

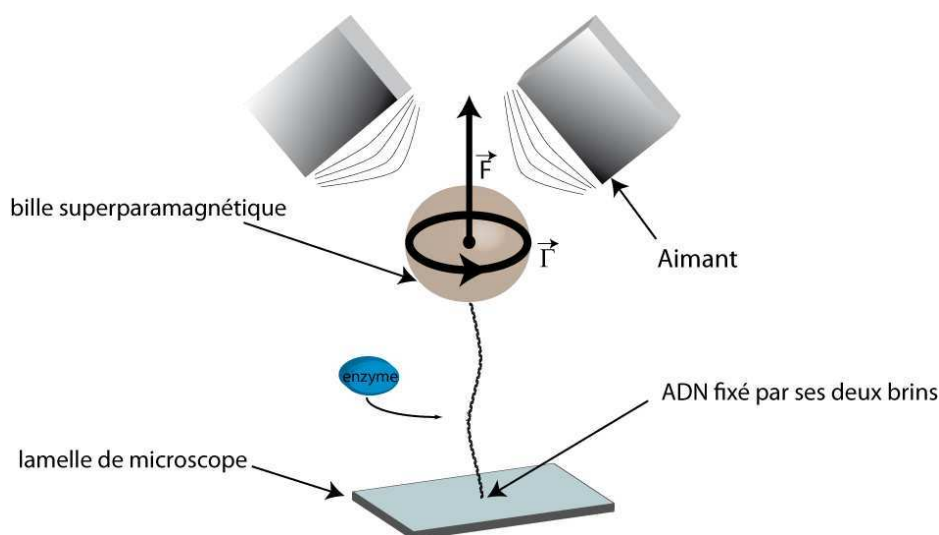


Figure 29 : Principe de fonctionnement d'une pince magnétique

Un champ magnétique permet de piéger une particule paramagnétique et de lui appliquer un couple dont l'intensité est contrôlée. La capacité de déplacer et de faire tourner la bille offre la possibilité par exemple de suivre l'activité d'un enzyme modifiant le sur-enroulement de l'ADN comme les topoisomérases.

Des travaux réalisés par Ebright *et coll.* ont par exemple permis de suivre en détail l'étape d'initiation de la transcription par l'ARN polymérase avec une résolution de l'ordre de la paire de base (Revyakin *et coll.* 2003; Revyakin *et coll.* 2004; Revyakin *et coll.* 2006). En outre, l'étude de la translocase Ftsk (Saleh *et coll.* 2004; Bigot *et coll.* 2006; Lionnet *et coll.* 2006; Ptacin *et coll.* 2006) a permis de mettre en évidence le site de l'ADN reconnu par l'enzyme et la directionnalité du déplacement.

En ce qui concerne les topoisomérases, cette technique a permis de suivre en temps réel la relaxation du sur-enroulement (Figure 30). En particulier, pour la topoisomérase IV il a été possible de mesurer son affinité relative différente pour les super-tours positifs et négatifs et de montrer que cette enzyme est capable de courber et de tordre localement l'ADN lors de sa fixation (Charvin *et coll.* 2005). A l'opposé, la topoisomérase II ne montre aucune préférence pour un certain type de super-tour (Charvin *et coll.* 2003). Pour les topoisomérases, cette méthode a également permis de montrer que la topoisomérase IB était sensible au couple

de rotation quelle subissait. Enfin, pour l'hélicase UrvD (Figure 30), Bensimon *et coll.* ont montré que cette enzyme était capable de changer de brin puis de séparer les brins d'ADN dans l'autre direction (Dessinges *et coll.* 2004).

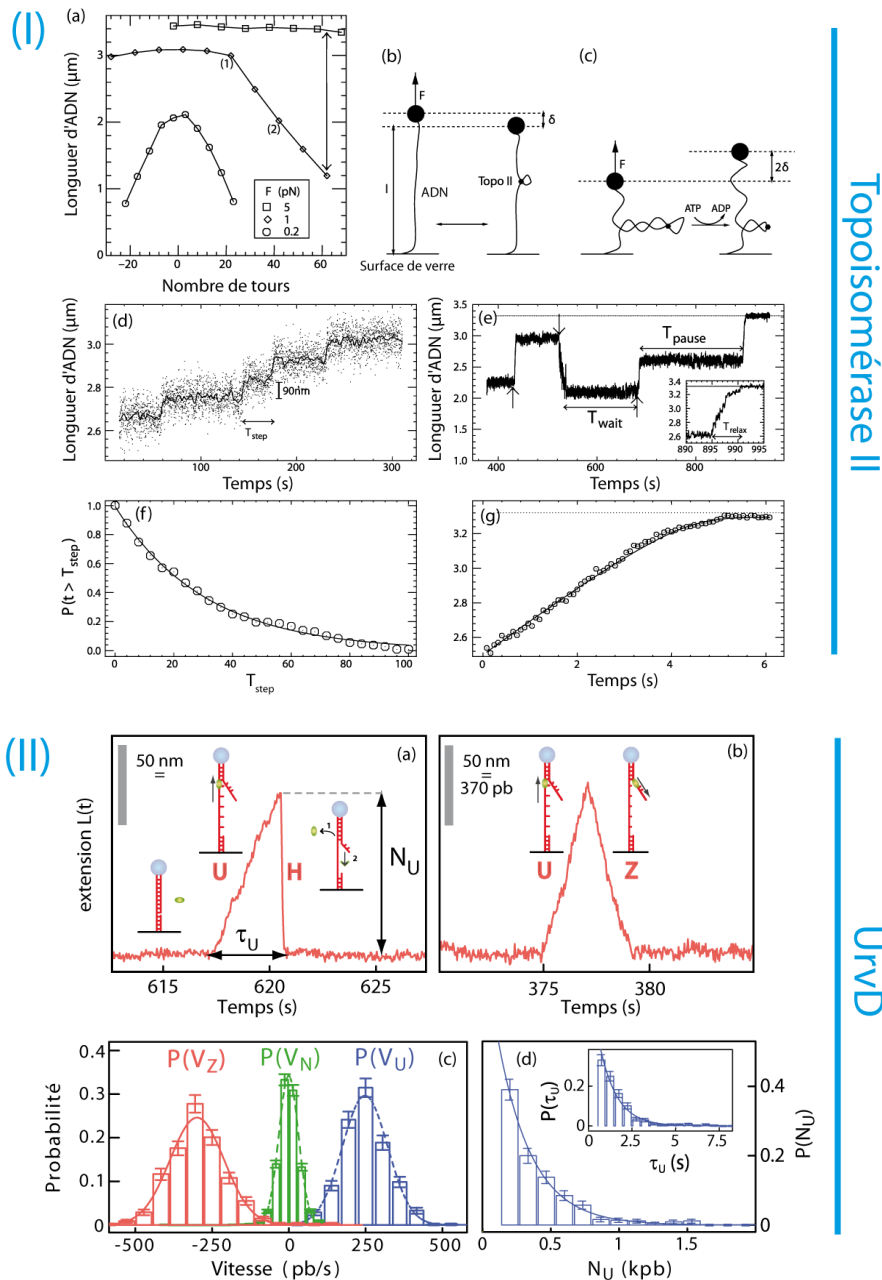


Figure 30 : Exemples de deux expériences utilisant des pinces magnétiques : l'étude de la Topoisomérase II et de l'Hélicase UrvD

De nombreux enzymes liés à l'ADN ont été étudiés à l'aide des pinces magnétiques (Lionnet *et coll.* 2006). (I) Il a été montré que la topoisomérase II est capable de se fixer à l'ADN et de relaxer le sur-enroulement positif et négatif. La mesure en temps réel de son activité permet en outre d'extraire les paramètres cinétiques et la sensibilité à une force de cette action. Adapté de (Strick *et coll.* 2000). (II) L'étude de l'hélicase UrvD à l'échelle de la molécule unique a permis de mettre en évidence le fait que cet enzyme est capable (a) de dénaturer l'ADN dans le sens 3' vers 5' puis dans certains cas (b) de changer de brin et de se repropager dans le sens 5' vers 3' à la même vitesse (c). Adapté de (Dessinges *et coll.* 2004).

1.3.1.3 Lien avec l'étude des facteurs de remodelage de la chromatine

Comme on le voit ces techniques de molécules uniques ont permis d'étudier en détail le mécanisme de bon nombre de moteurs moléculaires. La force de ces techniques étant de pouvoir capturer en temps réel et sur des objets isolés des mouvements nanométriques. La majorité de ces enzymes sont capables d'agir sur un support (les microtubules, l'actine, l'ADN) que l'on peut supposer immobile ou dont le mouvement peut être négligé. Dans notre cas nous nous sommes intéressés à des moteurs de la chromatine capables de modifier la structure et la dynamique des nucléosomes. A la différence de l'ADN ou de l'actine, la dynamique interne des nucléosomes joue un rôle crucial dans la fonction du moteur qui agit sur ce support 'dynamique'. Il a par exemple été montré que dans des conditions de dilution élevée (qui est une contrainte liée à la plupart des expériences de molécules uniques) il est difficile de contrôler la stabilité de la chromatine reconstituée (Claudet *et coll.* 2005). En cherchant à conserver l'approche « molécule unique » et pour contrôler en permanence l'état des objets que nous souhaitons étudier, nous avons donc choisi d'utiliser une technique de microscopie, la Microscopie à Force Atomique (AFM pour *Atomic Force Microscopy*). L'imagerie AFM est suffisamment résolue spatialement pour pouvoir étudier des mouvements de quelques nanomètres et, associée à une méthode de déposition adaptée (l'immobilisation sur AP-mica, voir chapitre 2), elle permet de préserver autant que possible la structure 3D de ces biomolécules. Même si nous perdons à priori la composante temporelle, ce choix nous permettra de travailler sur un nombre importants de molécules isolées et construire les distributions de probabilité des paramètres d'intérêts comme nous le verrons dans la partie résultats (chapitres 3 à 6).

Dans la partie suivante nous allons nous intéresser brièvement aux différentes méthodologies qui ont permis de modéliser les résultats obtenus par les expériences de molécules uniques sur les moteurs du cytosquelette et les moteurs moléculaires à ADN ou ARN. Cela nous permettra de d'introduire les approches que nous avons utilisé pour modéliser la dynamique de mono-nucléosomes et de la chromatine à l'équilibre ou soumis à l'action d'un facteur de remodelage.

1.3.2 La Modélisation des moteurs moléculaires

La grande quantité de données issues des expériences de molécules uniques sur les moteurs moléculaires a stimulé des avancées notables du point de vue de la modélisation. La construction d'un cadre théorique décrivant la dynamique de telles molécules implique un certain nombre de contraintes comme les lois thermodynamiques du système mais aussi l'utilisation des symétries présentes comme la périodicité, la polarité ou la chiralité. De plus, l'efficacité de tels modèles consiste à ne pas s'arrêter à une description quantitative des données mais de conduire à proposer des hypothèses mécanistiques qui peuvent par la suite être évaluées expérimentalement.

Pour répondre à cette tâche, deux types principaux de modèles ont été utilisés avec succès. Le premier type de modèle ou « modèle discret » propose une description du système vu comme un ensemble fini d'états reliés entre eux par des transitions stochastiques (Figure 31). Le deuxième que nous nommerons « modèle continu » est basé sur la diffusion de la particule étudiée dans un potentiel asymétrique à plusieurs états (Figure 31). Pour revue sur ces types de modèles on se référera à (Xing *et coll.* 2005; Kolomeisky *et coll.* 2007).

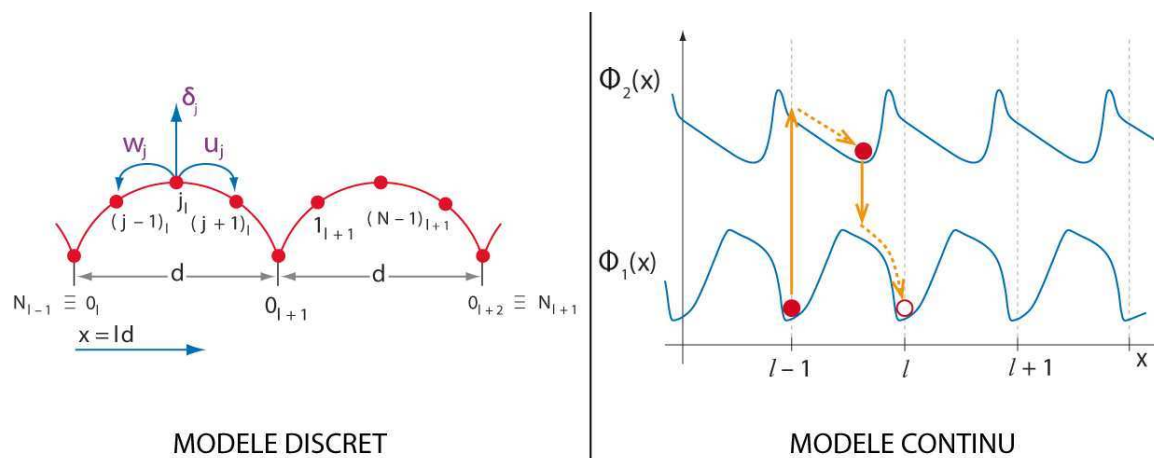


Figure 31 : Deux types de modélisations des moteurs moléculaires.

De manière générale, on peut classer les modèles décrivant les moteurs moléculaires en deux classes : discrets ou continus. (à gauche) Un modèle discret de cycle catalytique à N étapes correspondantes à un pas de longueur d . (à droite) Un modèle continu à deux états/potentiels asymétriques périodiques décrivant un mouvement dirigé à une dimension.

1.3.2.1 Modèles discrets

Ils correspondent à la retranscription en cinétique chimique des transitions entre un groupe d'états définis décrivant l'action du moteur. Dans le cas le plus simple on considère un cycle catalytique à N étapes réversibles ou non. Chaque étape j conduit avec une probabilité v_j à l'étape $j+1$ et avec une probabilité w_j à l'étape précédente $j-1$. En outre, le moteur peut « se décrocher » avec une probabilité δ_j à chaque étape. Le système est périodique puisque la dernière des N étapes du cycle est suivie par la première étape. Au moins une étape de cycle dépendant de l'hydrolyse d'une molécule d'ATP. On peut comprendre chaque étape comme la liaison ou la dissociation d'une molécule ou bien comme la modification de la structure ou de la position du moteur. A partir des taux de transitions on peut notamment calculer la processivité ou la stochasticité du moteur moléculaire considéré qui pourront être reliées aux données expérimentales.

Ce type de modèle a été appliqué avec succès à l'étude de nombreux moteurs moléculaires. On peut citer par exemple kinésine (Fisher *et coll.* 2001), la myosine (Kolomeisky *et coll.* 2003) ou RSC vu comme une translocase à ADN (Fischer *et coll.* 2007).

1.3.2.2 Modèles continus

Dans cette approche « à la physicienne » aussi appelé modèle Markov-Fokker-Planck, (Julicher *et coll.* 1997) le moteur moléculaire étudié diffuse sur une surface d'énergie libre (ou potentiel) périodique et asymétrique décrivant de manière effective à la fois l'environnement et l'état du moteur. Typiquement on modélise les changement d'états du moteur par le basculement d'une forme de potentiel à une autre. En effet, on suppose que l'injection d'énergie chimique (c'est à dire l'hydrolyse de l'ATP) entraîne une modification de configuration de la protéine motrice qui modifie le potentiel. On a représenté sur la Figure 31 un modèle à deux potentiels alternatif (Φ_1 et Φ_2) dans lequel diffuse une particule. A chaque pas de temps le moteur peut soit diffuser dans le potentiel sur lequel il se trouve soit transiter vers l'autre potentiel. Comme on le pressent ici, si les taux de transfert $1 \rightarrow 2$ et $2 \rightarrow 1$ sont proches l'un de l'autre on va obtenir un mouvement directionnel vers les grandes valeurs de x .

Typiquement ce type de modèle continu à 2 états peut donc être utilisé pour décrire l'avancé d'un moteur du cytosquelette comme la kinésine ou la myosine (Julicher *et coll.* 1997). Néanmoins des modèles continus plus complexes ont aussi été développés pour rendre compte d'autres types de moteurs comme l'ATP synthase (Xing *et coll.* 2005), le moteur rotatif du flagelle bactérien (Elston *et coll.* 1997) ou l'ARN polymérase (Wang *et coll.* 1998).

1.3.2.3 Comparaison des deux types de modélisation

Nous évaluons ici les avantages de chaque type de modèle.

Avantage Continu / Discret

- ❑ Il y a un lien clair entre le potentiel utilisé et la structure moléculaire du moteur ce qui permet d'extraire des informations structurales. Ceci est en général difficile dans le cas des modèles discrets.
- ❑ La relation force-vitesse qui permet de caractériser de nombreuses propriétés du moteur moléculaire peut être directement déduite par le formalisme continu. A l'opposé, il faut souvent supposer une forme de potentiel pour l'obtenir en partant d'un modèle discret.
- ❑ L'incorporation d'effets coopératifs entre moteurs peut être prise en compte facilement par la mise en place d'un couplage entre particules
- ❑ Les modèles discrets ne permettent en général de rendre compte que d'un seul chemin réactionnel et ne permettent pas en particulier de rendre compte de chemins annexes dépendants de la concentration en moteurs (Liao *et coll.* 2005).

Avantage Discret / Continu

- ❑ L'évolution du système dans un modèle discret est beaucoup plus légère à déterminer du point de vue calculatoire.
- ❑ Il est souvent difficile d'accéder au potentiel expérimental, la détermination d'un potentiel théorique à la base du modèle continu requiert souvent des hypothèses très fortes.
- ❑ La connaissance des taux de transition entre potentiel est également nécessaire dans le modèle continu

En fonction du but recherché et de la connaissance du système étudié, on utilisera donc soit l'une soit l'autre des approches. Nous verrons dans la partie résultats que nous avons utilisé un modèle continu pour modéliser le glissement par RSC et la relaxation thermique de mono-nucléosomes alors que nous avons utilisé un modèle discret pour étudier le glissement par RSC de di-nucléosomes.

Dans cette dernière partie, nous allons donc décrire ce qui est connu à l'heure actuelle sur le mécanisme d'action des facteurs de remodelage de la chromatine de la famille swi2/snf (dont SWI/SNF et RSC) qui sont au cœur de ce travail de thèse.

1.3.3 Etude mécanistiques des facteurs de remodelage de chromatine

Après nous nous être intéressé aux moteurs moléculaires en général et aux méthodes qui ont permis d'étudier leurs mécanismes d'action nous allons dans ce qui suit nous focaliser sur les résultats obtenus pour une catégorie particulière de moteur moléculaire : les facteurs de remodelage de la chromatine. C'est cette classe d'enzymes et en particulier SWI/SNF et RSC que nous étudierons dans les chapitres 5 et 6.

Le mécanisme d'action des facteurs de remodelage de la chromatine a fait l'objet de très nombreux travaux depuis une dizaine d'années (pour revue, (Becker *et coll.* 2002; Saha *et coll.* 2006)). En dépit des progrès réalisés, de nombreuses zones d'ombre persistent dans le mode d'action et le détail de ce phénomène. Comme nous le verrons, au-delà des expériences biochimiques de nombreuses études de molécules uniques, sur lequel nous nous attarderons, ont jeté un regard nouveau sur ce problème.

1.3.3.1 Expériences biochimiques

Comme nous l'avons vu la découverte de SWI/SNF fut réalisée dans le cadre d'études génétiques sur la transcription. Elles mirent en lumière que l'absence de SWI/SNF induit une répression de la transcription de certains gènes (phénotype *swi/snf*-) mais que cette inhibition est levée lorsque l'on déstabilise le nucléosome (mutations SIN) (Hirschhorn *et coll.* 1992; Winston *et coll.* 1992). Un fois isolé, ce complexe fut donc nommé facteur de remodelage puisqu'il était capable de modifier la structure de la chromatine et de la rendre plus permissive à la transcription sans que l'on comprenne exactement de quelle manière (Cote *et coll.* 1994; Wang *et coll.* 1996). Il a ensuite été fait état du fait que SWI/SNF était capable de rendre accessible aux nucléases (endo- et exo-nucléases) et à certains facteurs de transcription l'ADN nucléosomal de manière persistante à son action (Owen-Hughes *et coll.* 1996). Dans un deuxième temps seulement, il a été démontré que ces complexes ne détruisent pas complètement le nucléosome et qu'ils sont aussi capables de le faire glisser par rapport à l'ADN (Hamiche *et coll.* 1999; Langst *et coll.* 1999; Whitehouse *et coll.* 1999).

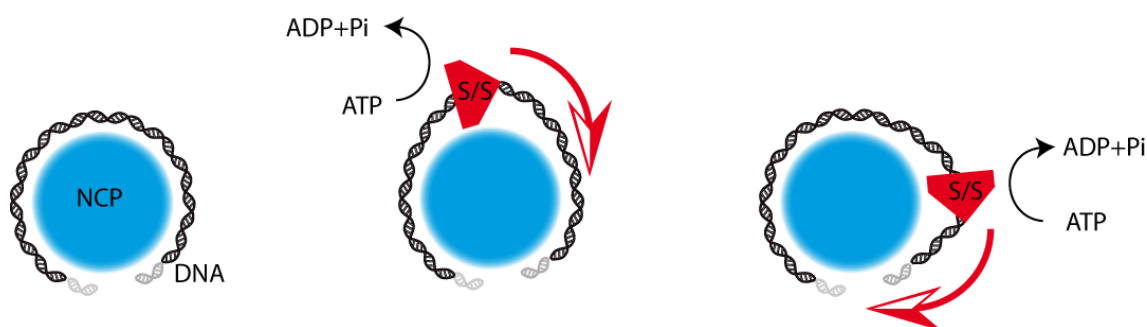


Figure 32 : SWI/SNF vu comme une translocase à ADN

Dans un premier temps le remodelage de la chromatine a été interprété comme une conséquence secondaire de la faculté des facteurs de la famille SWI/SNF à se déplacer sur l'ADN. Le glissement du nucléosome était alors vu comme la conséquence de la translocation de l'enzyme à travers le nucléosome. D'après (Tyler *et coll.* 1999)]

Ce glissement fut tout d'abord interprété comme une conséquence secondaire de la restructuration du nucléosome par ces facteurs de remodelage ou même un artefact lié à l'utilisation de fragments courts d'ADN. L'un des premiers modèles mécanistiques de SWI/SNF par (Tyler *et coll.* 1999) propose en effet que ce facteur est une sorte de translocase à ADN qui se déplace sur l'ADN double brin en hydrolysant de l'ATP et que lorsque ce dernier rencontre un nucléosome il passe au travers en le déstabilisant à la manière d'une ARN Polymérase (Figure 32). De plus, lorsqu'il fut montré que l'action de certains facteurs de remodelage conduit à l'éviction de nucléosomes *in vivo* sur certains promoteurs (Korber *et coll.* 2004; Gutierrez *et coll.* 2007), il fut proposé que leur rôle serait de détruire les nucléosomes présents sur le promoteur.

A l'opposé, dans certains cas le recrutement de facteurs de remodelage au niveau de promoteurs particuliers a pu être relié à un changement de position *in vivo* du nucléosome (Goldmark *et coll.* 2000; Kent *et coll.* 2001; Lomvardas *et coll.* 2001).

Le fait que la plupart des facteurs de remodelage contiennent de multiples domaines de fixation à la fois à l'ADN et aux histones (Becker *et coll.* 2002; Narlikar *et coll.* 2002) et que leur activité ATPase puisse dépendre de la présence d'un nucléosome montrent néanmoins que leur substrat est bien le nucléosome (Racki *et coll.* 2008). En outre, des études précises de ce phénomène montrent que le glissement du nucléosome est la base du phénomène de remodelage et que ces facteurs sont capables d'internaliser plusieurs dizaines de paires de bases d'ADN à l'intérieur du nucléosome sans le détruire (Saha *et coll.* 2005; Zofall *et coll.* 2006). Le glissement serait donc une étape initiale et l'éviction son résultat si l'action du moteur n'est pas restreinte .

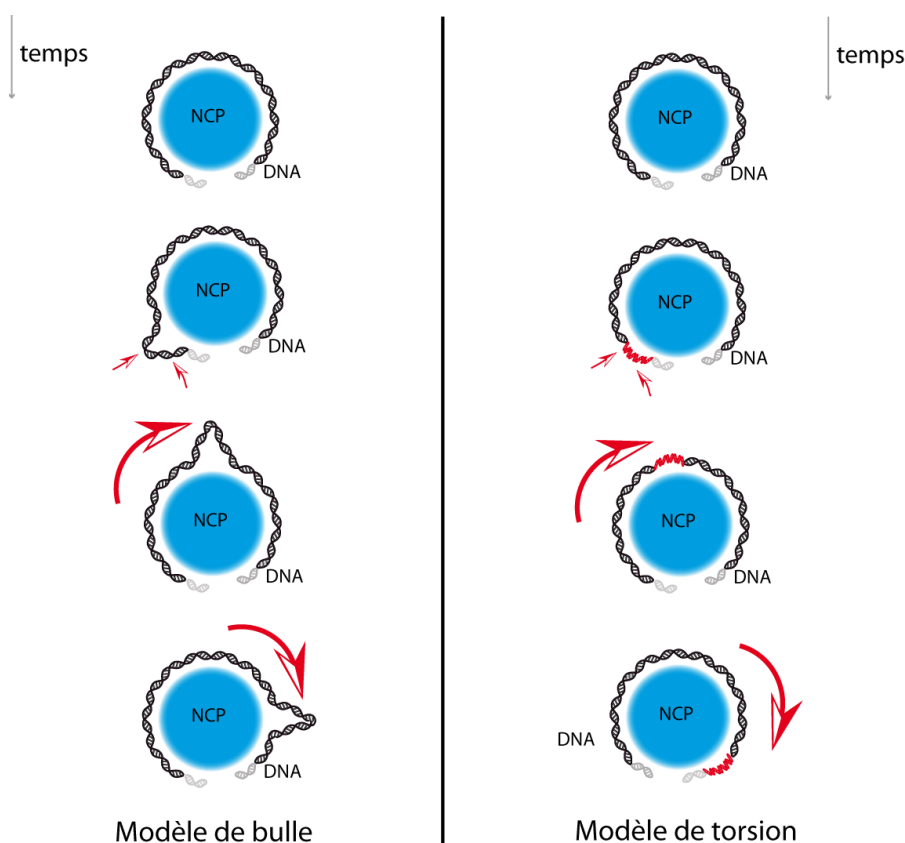


Figure 33 : Deux modèles physiques de glissement du nucléosome

(à gauche) Modèle de bulle dans lequel une bulle d'ADN est créée à l'entrée du nucléosome sous l'action d'un complexe de remodelage et/ou des fluctuations thermiques, puis se propage pour ressortir de l'autre côté du nucléosome. Le pas est dans ce cas un multiple de 10 pb (à droite) Modèle de torsion, où cette fois le défaut est une déformation angulaire (twist) qui peut être propagé activement ou thermiquement. Le pas du déplacement est dans ce cas 1 pb. Adapté d'après (Schiessel 2006)

Finalement, deux mécanismes physiques simples rendant compte des observations ont été proposés par Schiessel *et coll.* (Schiessel 2006) (Figure 33): le modèle de bulle (Kulic *et coll.* 2003) et le modèle de torsion (Kulic *et coll.* 2003). Dans le premier, le moteur de remodelage permet par son action ATP-dépendante de détruire quelques contacts ADN-histones. Les fluctuations thermiques permettent ensuite dans certains cas de recréer les contacts détruits mais de manière imparfaite en créant une boucle d'ADN ou bulle. Ceci a pour conséquence de créer un nucléosome possédant un défaut à l'entrée. Celui-ci est alors susceptible de diffuser rapidement puisque lorsque que le défaut se déplace, il crée autant de contacts qu'il en détruit. Les contacts entre l'ADN et les histones étant réparties toutes les 10 pb ce modèle postule que cette quantité correspond à l'élément minimum de déplacement du nucléosome. Dans le prolongement du modèle de diffusion thermique proposé par le même groupe, le facteur de remodelage se comporte comme un activateur de diffusion pour le nucléosome. Dans ce cas, le moteur aurait une action de type « pince à sucre » comme décrit sur le schéma de la Figure 34.

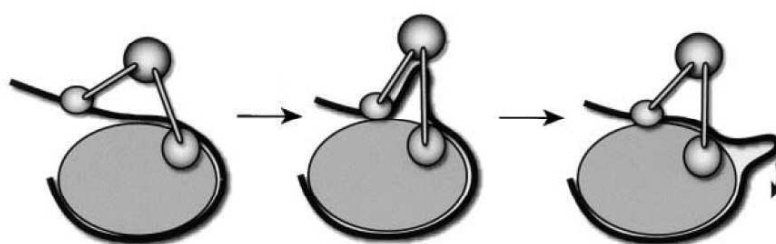


Figure 34 : Modèle de boucle assistée par un facteur de remodelage

Il a été proposé dans le cas de ISWI, que le facteur de remodelage serait capable de former à l'entrée du nucléosome une boucle à la manière d'une 'pince à sucre'. Cette boucle serait ensuite propagée comme dans le modèle de boucle proposé par Schiessel *et coll.* D'après (Langst *et coll.* 2001)

Dans le modèle de torsion le moteur induit une déformation angulaire (ou twist) du double brin d'ADN en entrée du nucléosome ce qui raccourci localement l'ADN de 1pb. Ce défaut de torsion pourrait alors être propagé activement ou alors thermiquement comme dans le modèle à bulle.

La situation réelle est probablement intermédiaire à ces deux modèles. En effet, pour RSC ou SWI/SNF (ou Mi2) par exemple, il a été montré que l'induction d'un défaut de torsion est, en partie seulement, nécessaire à la translocation de l'ADN à l'intérieur du nucléosome (Aoyagi *et coll.* 2002; Aoyagi *et coll.* 2002; Saha *et coll.* 2002; Aoyagi *et coll.* 2003). L'existence d'un pas caractéristique pour ce déplacement et la manière dont la contrainte mécanique du moteur est propagée reste aujourd'hui sujet à caution. En particulier, il a été mesuré différentes valeurs pour ce pas élémentaire allant de 1 à 50 pb pour des moteurs très proches (Saha *et coll.* 2005; Zofall *et coll.* 2006). Cette discordance est probablement liée au caractère indirect des mesures effectuées. Enfin, il existe très probablement des différences mécanistiques entre les différentes familles de moteurs (pour revue voir (Becker *et coll.* 2002)).

1.3.3.2 Expériences en molécules uniques et études structurales

Bien que très instructives, ces études ne peuvent intrinsèquement permettre de conclure sur le mécanisme d'action de ces moteurs. Tout d'abord les méthodes utilisées sont toutes indirectes et n'observent pas réellement l'action du moteur sur son substrat mais seulement les conséquences moyennes de cette action sur une partie du nucléosome mesurées par l'intermédiaire d'une autre réaction (le plus souvent l'action d'une nucléase). Les modèles proposés ne peuvent alors être véritablement testés de manière quantitative. Il est donc nécessaire de suivre au niveau de la

molécule unique voire en temps réel ce phénomène pour conclure. La compréhension du mécanisme physique du remodelage ne pouvant se faire qu'à cette échelle par le suivi d'un évènement ou l'extraction de données statistiques sur des populations et non pas uniquement sur des valeurs moyennes, de nombreuses expériences de molécules uniques ont déjà été réalisées pour l'étude de facteurs de remodelage avec des techniques allant des pinces optiques aux pinces magnétiques en passant par l'AFM et la cryo-microscopie électronique (cryoEM). Nous nous focaliserons seulement sur les expériences concernant les deux moteurs que nous avons étudiés : SWI/SNF et RSC. Malheureusement nombre d'entre elles restent aujourd'hui difficiles à interpréter.

Avant de nous tourner vers les études de molécules uniques où les facteurs de remodelage interagissent avec le nucléosome, on peut citer l'étude par pinces magnétiques du facteur de remodelage RSC en présence d'un fragment d'ADN (Lia *et coll.* 2006). En mesurant en temps réel et à force constante la longueur du fragment en interaction avec RSC, les auteurs mettent en évidence pour la première fois de manière directe, la capacité de cet enzyme à transloquer efficacement plusieurs centaines de paires de base d'ADN en quelques secondes (Figure 35). Néanmoins, cette processivité considérable disparaît pour des forces appliquées supérieures au piconewton, ce qui rend difficile l'interprétation de ces résultats dans un contexte chromatinien.

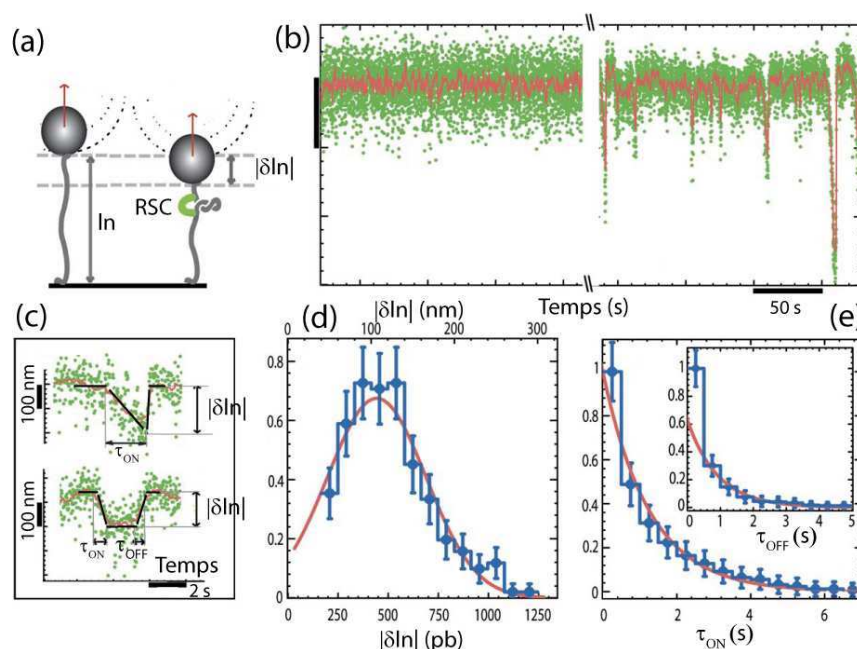


Figure 35 : RSC est une translocase de l'ADN.

(a) et (b) L'action de RSC sur un fragment d'ADN est suivie par le raccourcissement de l'ADN. (c), (d) et (e) En moyenne, RSC est capable de transloquer 400 pb en 2 secondes. Cette action est ATP-dépendante. D'après (Lia *et coll.* 2006)

Les premières études menées par des techniques physiques sur des nucléosomes furent celles menées par Schnitzler et coll. (2001) en AFM (Schnitzler *et coll.* 2001). Dans cette étude les auteurs s'intéressent à des mono-, di- et oligo-nucléosomes en présence de hSWI/SNF. Ils montrent que ce facteur est capable de déstabiliser (éviction) et de désorganiser la position des nucléosomes (randomisation) pour une fibre de nucléosomes reconstituée sur la séquence positionnante répétée 5S (Figure 36). Cette étude est la première à montrer visuellement le déplacement des nucléosomes ou leur altération. La technique étant par essence structurale elle permet de montrer que le nucléosome remodelé reste un nucléosome intact. Néanmoins l'utilisation d'un agent fixateur tel

que le glutaraldéhyde et le manque de données quantitatives ne permet pas de remonter à un mécanisme physique.

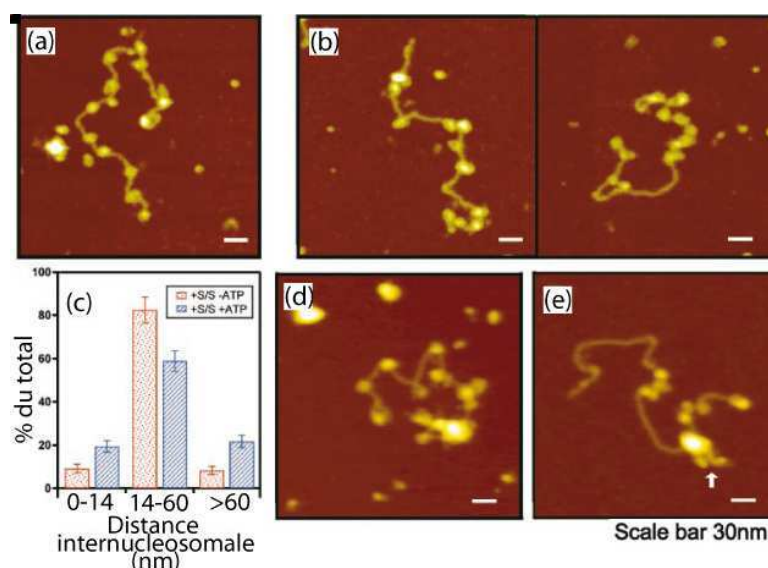


Figure 36 : Désorganisation du chapelet nucléosomal par SWI/SNF

Images AFM d'un chapelet nucléosomal fixé au glutaraldéhyde en présence de SWI/SNF, (a) et (d) sans ATP, et (b) et (e) avec ATP. Sur les images (d) et (e) on peut distinguer le facteur de remodelage SWI/SNF complexé à la chromatine. (c) histogramme des distances inter-nucléosomales sans et avec ATP. L'effet de SWI/SNF semble significatif sur les images (b) et (e) mais relativement faible sur la distribution (c). D'après (Schnitzler *et coll.* 2001).

En plus de cette étude, les travaux AFM de Lohr *et coll.* (Wang *et coll.* 2004; Wang *et coll.* 2005; Lohr *et coll.* 2007) se sont consacrés au remodelage par hSWI/SNF de chromatines reconstituées avec la séquence positionnante MMTV. Pour ce faire, ils utilisent une surface AP-mica sur laquelle ils adsorbent le fixateur glutaraldéhyde. Ils ajoutent alors ensuite les chromatines qui viennent se lier covalamment à la surface fonctionnalisée (Wang *et coll.* 2002). Une première série d'images en liquide permet d'acquérir le témoin négatif puis ils ajoutent le moteur au tampon et imagent à nouveau la même zone (Figure 37). Ils concluent que l'ajout de hSWI/SNF est associé à une diminution de hauteur des nucléosomes et modifie dans certains cas la trajectoire des ADNs de liaison. Malheureusement, et de la même manière que précédemment, le fait de fixer les chromatines empêche très probablement le moteur de se lier, d'agir puis de se dissocier de manière normale. Cette étude tend donc à sous estimer de manière importante l'effet du remodelage.

En parallèle à ces travaux, ce même groupe a élaboré une technique de reconnaissance spécifique par anticorps. Dans cette méthode, la pointe AFM est fonctionnalisée par des anticorps anti-H3 ou anti-H2A (Stroh *et coll.* 2004). En utilisant un mode d'imagerie particulier (qui permet d'obtenir en plus de l'image topographique une image en énergie d'adhésion pointe-surface) (voir Figure 37), les auteurs ont pu visualiser les zones de l'image correspondantes à un nucléosome sous forme d'octamère ou sous forme de tetramère où il manque les dimères (H2A-H2B). Ils ont alors montré que l'action de SWI/SNF induit dans certains cas la disparition des dimères (Bash *et coll.* 2006). Dans ces deux études l'utilisation d'un fixateur chimique pose problème puisque ce dernier peut modifier la structure de la chromatine et/ou interférer avec l'action du remodeleur. Néanmoins ces résultats permettent de confirmer de manière qualitative et à l'échelle d'un nucléosome, certaines données biochimiques comme l'éviction et la randomisation.

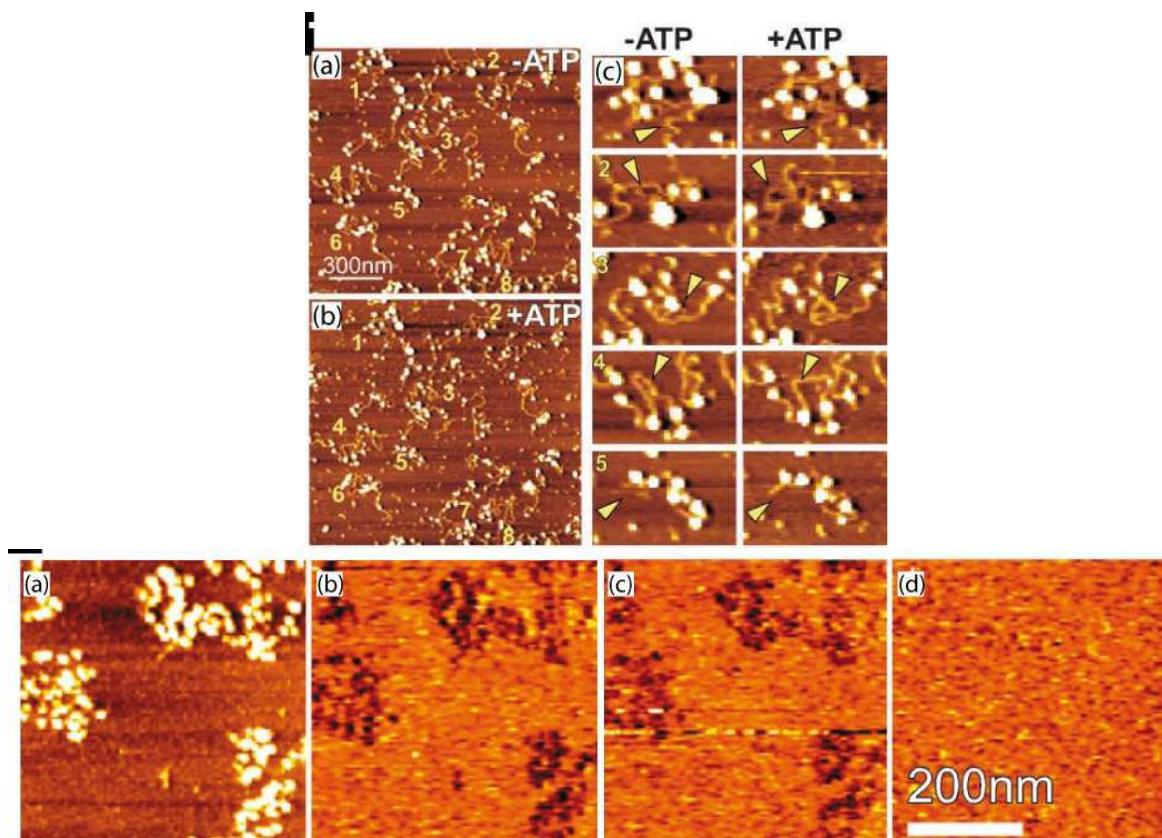


Figure 37 : Etudes AFM en solution du remodelage de la chromatine et images de reconnaissance spécifique par anticorps

(en haut) Images AFM en solution de chromatine reconstituée sur une séquence positionnante MMTV et déposée sur une surface AP-mica modifiée glutaraldéhyde, en présence de SWI/SNF et (a) en l'absence d'ATP et (b) en présence d'ATP. (c) zooms sur certaines zones avant et après l'ajout d'ATP dans la solution d'imagerie. Les flèches pointent les changements observés qui sont essentiellement des mouvements de l'ADN de liaison et des évictions de nucléosomes. D'après (Wang *et coll.* 2004).

(en bas) (a) Image AFM de topographie en solution de chromatine déposée sur une surface AP-mica modifiée glutaraldéhyde. (b) Image de reconnaissance spécifique par anticorps anti-(queue de H3). (c) même procédure que (b) mais en présence de BSA. (d) même procédure que (b) mais en présence d'un peptide identique à la queue de H3. L'ajout de la queue de l'histone H3 inhibe la reconnaissance des nucléosomes par la pointe AFM mais pas la BSA qui a une interaction non-spécifique avec l'anticorps. D'après (Stroh *et coll.* 2004).

Pour l'étude de ces facteurs de remodelage de la chromatine, une autre technique utilisée est le suivi en temps réel de la dénaturation de l'ADN à l'aide d'un système de pinces optiques (Shundrovsky *et coll.* 2006). Dans cette expérience très complexe un côté de l'ADN nucléosomal est libre alors que l'autre est attaché par un brin à la surface et par l'autre brin à une pince optique (Figure 38). L'application d'un déplacement à la surface par rapport au piège permet alors de dénaturer l'ADN en forçant l'ouverture (unzipping) tout en mesurant la force nécessaire à cette dénaturation. Si l'on dénature la totalité de l'ADN il est alors possible de repérer un signal de force supérieur pour la portion d'ADN protégée par le nucléosome (Figure 38d, Région 2). En effet, l'ADN nucléosomal est plus stable puisqu'il interagit favorablement avec les histones ($\Delta G = \Delta G_{\text{dénaturation}} + \Delta G_{\text{interaction avec les histones}}$). Ce motif sur le signal de force permet de repérer précisément la position de la dyade du nucléosome (± 2 pb d'après les auteurs).

Après l'ajout de SWI/SNF la distribution de position de la dyade s'élargit (28 pb contre 2 pb, voir Figure 38 e et g) et la position de moyenne de la dyade se déplace légèrement de 7 pb. Il est à noter que cette expérience a souvent été interprétée comme une preuve que le nucléosome est

déplacé directionnellement d'un pas de 28 pb. En réalité, ces résultats montrent que le mouvement de la dyade correspondrait plutôt à une diffusion lente autour de la position de départ. En outre, si l'on se réfère aux signaux de force montrés en supplément de l'article (Shundrovsky *et coll.* 2006) il apparaît que la signature nucléosomale, et donc la structure du nucléosome, semble modifiée pendant l'expérience. Par ailleurs, cette étude ne montre que très peu d'événements glissés sur plus de 50bp en discordance avec la plupart de résultats précédents dans la littérature. Il semble donc que la tension imposée empêche le glissement. Cependant, comme nous le verrons dans la partie résultat (chapitre 5), il est possible d'expliquer ces résultats par la formation d'un état restructuré métastable avec plus de 147 pb à l'intérieur du complexe nucléosomal

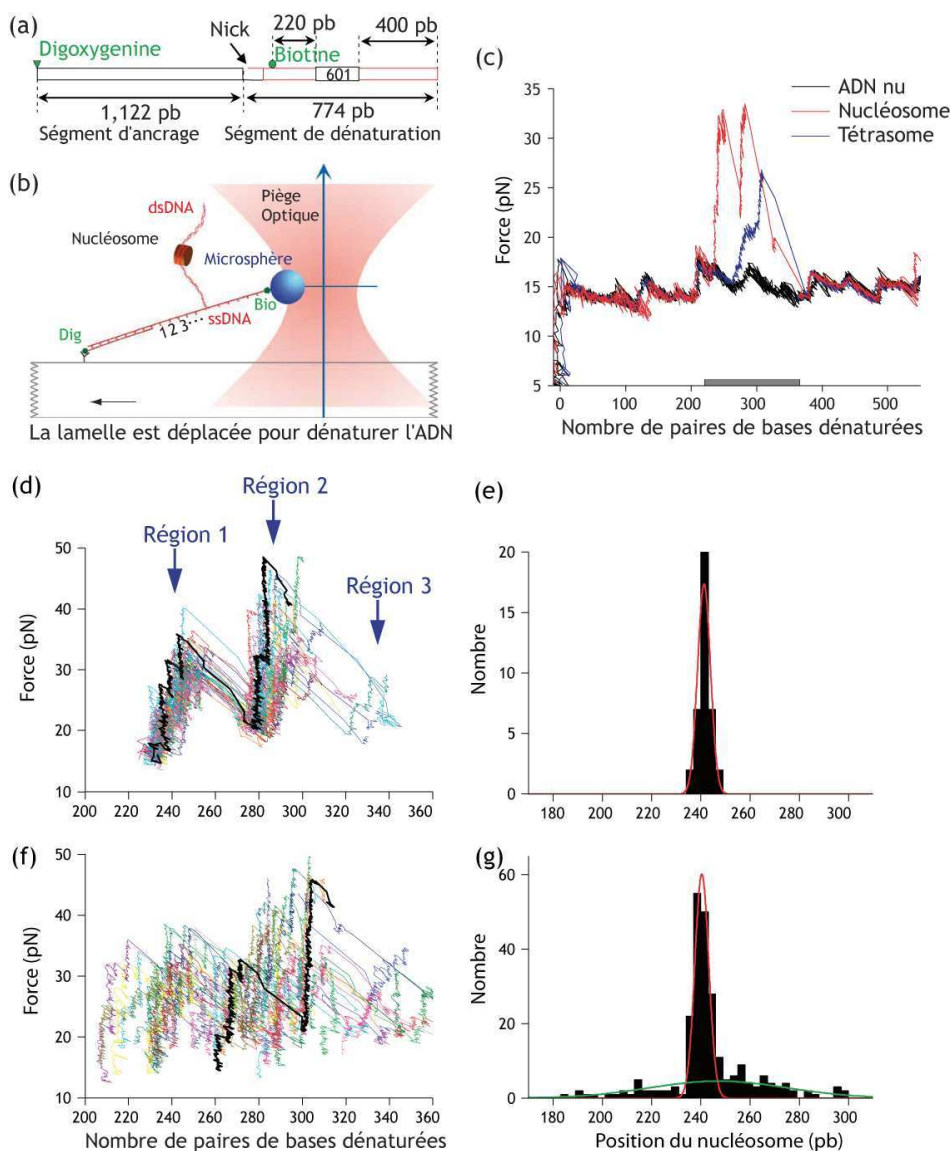


Figure 38 : Expériences de dénaturation de l'ADN et remodelage par SWI/SNF

(a) construction du fragment d'ADN contenant un nucléosome unique et utilisé dans cette expérience. (b) schéma du montage permettant de dénaturer l'ADN en tirant sur un des brins accroché à une surface que l'on déplace, l'autre brin étant lié à une bille retenue par une pince optique, qui permet également de mesurer la force nécessaire pour dénaturer l'ADN. (c) signal de force typique pour différents substrats en fonction du nombre de paires de bases dénaturées. (d) et (f) signaux de forces le long de l'ADN nucléosomal, et (e) et (g) distributions de positions des nucléosomes correspondantes. L'expérience est réalisée pour (d) et (e) en l'absence de SWI/SNF, pour (f) et (g) en présence de SWI/SNF et d'ATP. Adapté de (Shundrovsky *et coll.* 2006).

Une autre série d'expériences par Bustamante *et coll.* publiée à la même période (Zhang *et coll.* 2006) utilise un système de pinces optiques pour le suivre le remodelage par SWI/SNF. Dans cette étude, une fibre comportant quelques nucléosomes (de 0 à 4) positionnés par la séquence positionnante 601 entourée par deux longs brins d'ADN est tenue entre une pince optique et une surface (Figure 39). En présence de SWI/SNF et RSC ils observent un raccourcissement du fragment pouvant correspondre à des boucles formées par le moteur. Cet effet est même présent pour de l'ADN nu en présence du moteur mais pour des tensions appliquées inférieures à 1pN. Au-dessus de cette force le raccourcissement n'est présent que pour des fibres possédant des nucléosomes. Le montage de pinces optiques permet de dérouler les nucléosomes en leur appliquant une force supérieure à 65 pN, ce qui rend possible, après coup, de compter le nombre de nucléosomes qui étaient présents lors de l'expérience.

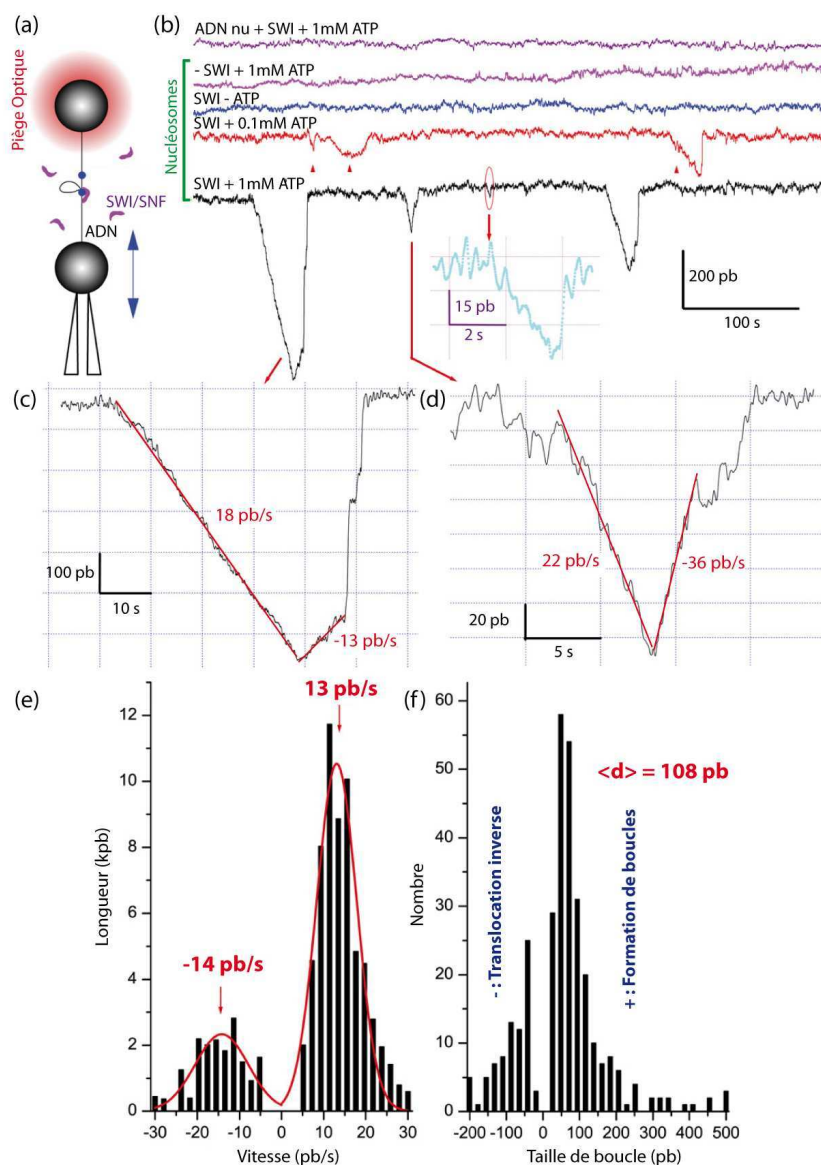


Figure 39 : Expériences de pinces optiques et remodelage par RSC

(a) Montage expérimental : l'ADN est tenu entre 2 billes, l'une maintenue fixe par une micro-pipette, la seconde par le piège optique, qui permet de tirer sur l'ADN en déplaçant la bille tout en maintenant la force exercée sur la bille constante grâce à un système de rétroaction (b) Signaux de raccourcissement en fonction du temps pour une tension constante appliquée de 3 pN. (c) et (d) Zooms sur quelques événements. (e) Histogramme des vitesses de raccourcissement. (f) Histogramme des longueurs de raccourcissement. Adapté de (Zhang *et coll.* 2006)

La taille des boucles observées en présence des moteurs s'étend jusqu'à plusieurs centaines de pb (Figure 39f). La valeur moyenne mesurée est d'une centaine de paires de base mais n'est que deux fois supérieure à la plus petite taille de boucle détectable. Cette série d'expérience montre en résumé que l'action du moteur s'accompagne d'un raccourcissement de l'ADN de liaison qui peut, dans ce cas, être très important. La valeur précise de raccourcissement semble néanmoins sujet à caution pour une chromatine qui comporte en général ~ 50 pb d'ADN de liaison et du fait que l'on ne peut exclure ici la présence de plusieurs moteurs travaillant simultanément ou la déstabilisation du nucléosome dans des conditions extrêmes de dilution. Il est à noter que ces expériences permettent de mesurer une force d'arrêt de l'action de SWI/SNF et RSC de l'ordre de 10 pN.

En complément de ces expériences de molécules uniques, des études récentes de cryo-microscopie électronique (cryoEM) se sont intéressées à la reconstruction à haute résolution de la structure des complexes RSC et SWI/SNF en présence d'ATP (méthode dite de 'tilt orthogonal reconstruction' ou (OTR)). Pour RSC, après analyse de plusieurs milliers d'images, l'étude de Nogales *et coll.* (Leschziner *et coll.* 2007) a permis de montrer que le complexe est une structure à plusieurs lobes formant une poche permettant d'englober totalement et parfaitement un nucléosome. De plus, l'un de ces lobes produit un mouvement alternatif en direction de cette poche formant deux isomères séparables par cette technique. Cette étude montre donc que le substrat de RSC est un nucléosome unique putativement modifié par un mouvement d'une des parties du complexe. En ce qui concerne SWI/SNF (Dechassa *et coll.* 2008), la reconstruction permet, elle aussi, de montrer une cavité centrale suffisante pour contenir au plus un nucléosome.

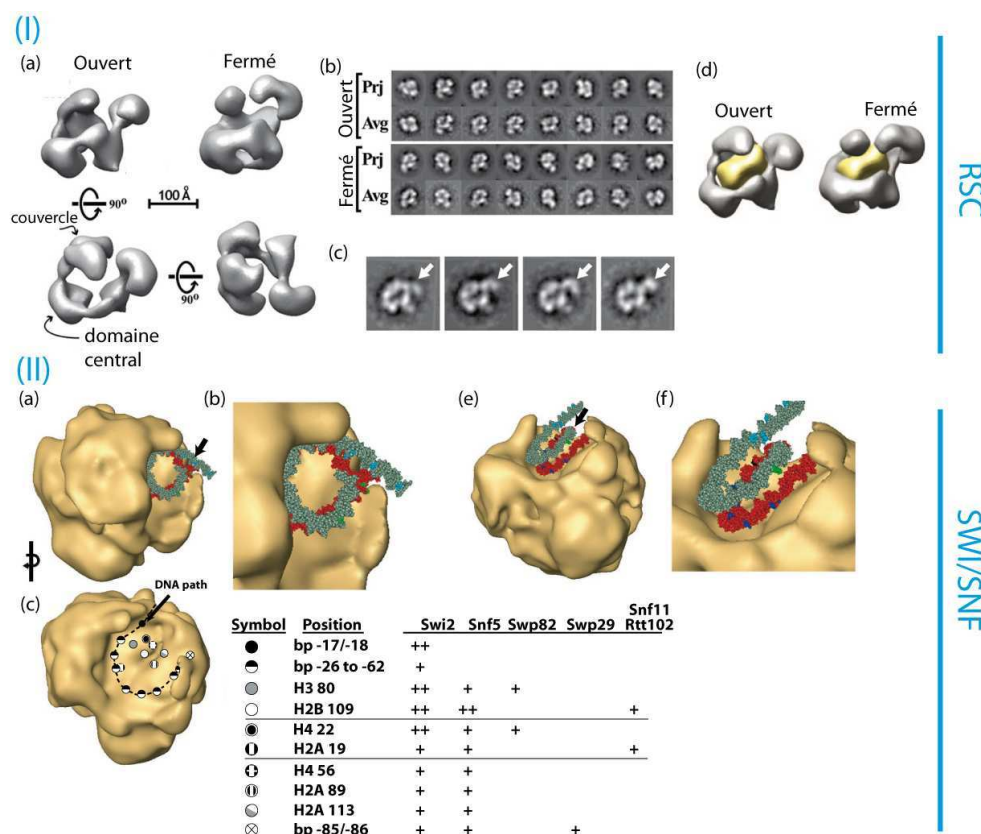


Figure 40 : Reconstruction à haute résolution des complexes de remodelage RSC et SWI/SNF par cryoEM

(I) RSC est formé de plusieurs lobes entourant une cavité centrale de la taille d'un nucléosome. L'un d'entre eux est flexible et présente une configuration ouverte et une configuration fermée. D'après (Leschziner *et coll.* 2007). (II) SWI/SNF forme une structure compacte autour d'une cavité centrale dont la taille correspond, elle aussi, à celle du nucléosome. D'après (Dechassa *et coll.* 2008)

Comme on le voit, ces différentes études ne permettent pas aujourd'hui de conclure sur le mécanisme d'action des facteurs de remodelage et en particulier de SWI/SNF et RSC. Pour résumer les points forts qu'elles mettent en avant on peut dire qu'elles réaffirment la faculté d'éviction, la capacité à désorganiser la position des nucléosomes sur une fibre et à déstabiliser la structure nucléosomale elle-même en étant capable de pomper à l'intérieur de celui-ci de l'ADN supplémentaire. Même si elles ne permettent pas de trancher définitivement ces études sont pourtant d'autant plus nécessaires que la compréhension fine du mécanisme physique du remodelage ne peut se faire qu'à l'échelle de la molécule unique par le suivi d'un événement ou l'extraction de données statistiques sur des populations et non pas sur des valeurs moyennes. Comme nous l'avons vu pour les moteurs du cytosquelette c'est l'étude en temps réel de ces objets qui a permis de résoudre leur mécanisme.

Nous proposons dans la partie résultats de développer un ensemble de procédures basées sur la microscopie à force atomique pour étudier les moteurs RSC et SWI/SNF en optant pour une approche la plus quantitative possible.

1.4 Projet de Thèse

L'objectif du travail de thèse détaillé dans ce qui va suivre est à la fois méthodologique et fondamental.

Du point de vue technique, nous avons cherché à accentuer les avantages propres de la microscopie à force atomique par rapport à d'autres types de microscopies et techniques de molécules uniques que sont la résolution spatiale et la relative vitesse d'acquisition. Le but étant d'obtenir des informations nombreuses (des milliers d'objets analysés) et d'une résolution nanométrique suffisante pour étudier des objets tels que l'ADN. Dans cette optique, nous avons ajouté une analyse d'images systématique et objective des données. Ceci nous permet de mesurer les paramètres recherchés (comme la position des nucléosomes au sein d'une fibre ou la longueur d'ADN complexée dans un mono-nucléosome) en ne faisant appel au choix de l'expérimentateur que dans la partie préparatoire de l'analyse. Un autre intérêt de cette analyse systématique est de pouvoir accumuler un grand nombre de données. En effet, pour ce type de mesure statistique, l'erreur est fortement dépendante du nombre d'événements mesurés (erreur $\propto \sigma/\sqrt{N}$, où σ est l'écart type de la distribution expérimentale, et N le nombre d'événements), ceci conduit donc à améliorer encore la résolution expérimentale. Pour résumer, nous avons cherché, dans chacun des sujets abordés, à tester la faisabilité d'une approche AFM quantitative appliquée à l'étude de la dynamique à l'équilibre et hors équilibre de la chromatine.

De point de vue de la biologie, les thèmes abordés sont de deux types : l'incorporation de variants d'histone et l'activité des facteurs de remodelage. Dans les deux cas nous nous sommes intéressé à l'impact de ces processus sur la structure et la dynamique des nucléosomes.

En ce qui concerne les histones variants, nous avons vu avec certains variants comme H2A.Z que les propriétés du nucléosome peuvent être modifiées lors de son incorporation. Nous avons donc cherché à savoir quels sont les effets structurels et dynamiques de la présence du variant d'histone H2A.Bbd (si fortement divergent de son histone conventionnelle) au sein du nucléosome. Pour ce faire, nous avons étudié des nucléosomes variants isolés mais aussi au sein d'une fibre à l'équilibre. Nous avons alors testé quels paramètres physiques étaient influencés par sa présence. Plus largement ce problème est important dans le sens où, à la différence du remodelage de la chromatine, ces modifications sont susceptibles de perdurer sur des temps longs (~ le cycle cellulaire ou plus) et d'avoir un rôle prépondérant dans l'architecture et l'activité des régions

chromatiniennes impliquées en empêchant par exemple la formation d'une fibre compacte de 30 nm.

En parallèle, du point de vue des facteurs de remodelage nous avons vu dans ce qui précède que les mécanismes d'action des moteurs moléculaires telle que SWI/SNF et RSC restent mal compris. C'est pourquoi nous avons étudié la dynamique hors équilibre d'un nucléosome isolé ou présent dans un oligo-nucléosome soumis à RSC ou SWI/SNF. Pour ce sujet, les questions posées ont alors été de plusieurs ordres : tout d'abord est-il possible de caractériser des états intermédiaires de la réaction de remodelage du nucléosome et lors du retour vers l'équilibre d'un nucléosome remodelé. Puis, à une autre échelle, quelle est la processivité, la directionnalité et la séquentialité de tels déplacements pour des di-, tri- ou oligo-nucléosomes ? L'objectif est alors de comprendre le rôle exact de cette sous-famille de moteurs dans l'organisation locale de la chromatine et son maintien.

Enfin du point de vue de la physique des systèmes biologiques, ces questions biologiques ont été l'occasion pour nous de tester un certain nombre de modèles simples. Par exemple, comment expliquer la plus grande accessibilité de fibre de nucléosomes variants ? Est-il possible d'en rendre compte en utilisant des outils issus de la physique des polymères ? Du point des facteurs de remodelage, est-il possible de décrire ces complexes comme de véritables moteurs moléculaires ? Quelles informations supplémentaires nous apporte ce type d'approche pour la compréhension de leur fonctionnement ?

Pour répondre à ces questions, les résultats du travail de thèse sont organisés en quatre parties, exposées à la suite du chapitre 2 qui présentent les méthodes mises en œuvre pour tirer partie, au mieux, du potentiel de l'imagerie par AFM. Le chapitre 3 présente l'ensemble des mesures effectuées sur les mono-nucléosomes à l'équilibre et en particulier l'effet du variant d'histone H2A.Bbd sur la conformation du nucléosome à l'équilibre. Dans une seconde partie nous avons généralisé cette étude de l'effet des variants d'histone sur la conformation et la dynamique d'une fibre de nucléosomes. Dans une troisième partie (chapitre 5) nous avons abordé les situations où le nucléosome isolé (ou mono-nucléosome) est placé hors équilibre par l'action des facteurs de remodelage (SWI/SNF et RSC) et nous avons suivi son retour vers l'équilibre. Enfin dans le chapitre 6, nous détaillons l'étude hors équilibre du remodelage de di-nucléosomes par RSC.

Ce travail étant aux croisements de différentes techniques et domaines, il n'aurait pas été possible pour moi de le réaliser seul. Je tiens donc à mettre en avant le rôle de chacune des personnes du laboratoire qui ont collaboré à ces projets. Avant toute chose, les protocoles de reconstitution et de purification utilisés au laboratoire ont été développés par Dimitri Anguelov. Il m'a formé aux techniques de bases de la biologie moléculaire et aux techniques propres à l'étude de la chromatine. Grâce à lui j'ai pu produire par moi-même l'ADN, les mono-nucléosomes et les mono-nucléosomes marqués utilisés dans les expériences AFM.

Les histones recombinants issus de corps d'inclusion ont été produits et purifiés selon les cas par Cécile Doyen, Manu Shukla ou Hervé Menoni. Les facteurs de remodelage ont été produits et purifiés à partir de levures au sein du laboratoire de Stefan Dimitrov à l'Institut Albert Bonniot. En ce qui concerne les chromatines conventionnelles et variantes, les fragments ADN utilisés ont été produits par Hervé Menoni à partir de plasmides issus d'une collaboration avec Daniela Rhodes au MRC à Cambridge (UK). De même les di-nucléosomes utilisés dans la dernière partie de ce travail ont été produits par Hervé.

2 Méthodes

2.1 La Microscopie à Force Atomique

Généralement, quand on parle d'un microscope, on pense microscope optique ou électronique. Ces microscopes créent une image agrandie d'un objet en focalisant des photons ou des électrons, sur lui. Les microscopes optiques et électroniques peuvent facilement générer des images agrandies d'un objet, avec un grossissement qui peut atteindre 1000 X pour un microscope optique, et 100000X pour un microscope électronique. Bien que ce soit des outils puissants, les images ainsi obtenues sont uniquement dans le plan parallèle à la surface de l'objet. Ces microscopes ne peuvent pas fournir facilement les dimensions verticales d'un objet déposé sur la surface ou même les caractéristiques topographiques de cette surface.

Le microscope à force atomique (AFM), développé dans le milieu des années 1980 (Binnig *et coll.* 1986), utilise une sonde mécanique très fine (quelques nanomètres) pour mettre en évidence les caractéristiques d'une surface à très petite échelle. Grâce à l'AFM, il est possible d'obtenir l'image d'un objet ou la topographie d'une surface quelconque avec de très forts grossissements, jusqu'à 1 000 000 X. De plus, le grossissement de l'AFM est dans les trois dimensions X, Y et Z et est cette technique ne nécessite en général aucun traitement ou marquage de l'échantillon.

2.1.1 Historique

Comme l'ont reconnu plus tard ses inventeurs (Binnig *et coll.* 1987), il n'aurait pas été possible de concevoir un tel système sans les avancées réalisées pour la conception des profilomètres. En effet, les premières tentatives pour agrandir les caractéristiques verticales d'une surface ont historiquement été réalisées bien auparavant. Un des premiers profilomètre ou profileur est montré dans la Figure 41. Ce profileur, inventé par Schmalz en 1929, utilisait un « bras de levier optique » pour suivre les mouvements d'une sonde montée à l'extrémité d'un cantilever (c'est à dire une micro-poutre déformable encastrée ou micro-levier). Un profil agrandi de la surface était alors généré en enregistrant le mouvement du stylet sur un papier photographique. Ce type de « microscope » générait des « images » avec un grossissement de plus de 1000X. Néanmoins un problème rencontré par ces profilomètres était la possible déformation de la sonde lors des collisions avec les caractéristiques trop abruptes de la surface. Ces déformations étaient le résultat de forces horizontales exercées sur la sonde lorsqu'elle rencontrait des objets trop hauts. Ce problème a été abordé pour la première fois par Becker en 1950 et plus tard par Lee. Ils ont alors suggéré de rendre oscillante la sonde entre une position au-dessus de la surface et une autre en contact avec la surface. Becker fit remarquer à cette occasion que lors de l'utilisation de ce profilomètre vibrant, la résolution des images dépendait de la finesse de la sonde. En 1971, Russell Young construisit le premier profilomètre sans contact. Dans son profilomètre, appelé « topographiner » (Young *et coll.* 1971), Young a utilisé le fait que le courant d'émission entre une

sonde métallique et une surface soit très dépendant de la distance les séparant pour des échantillons conducteurs. Dans le « topographiner », la sonde était montée directement sur une céramique piézoélectrique X-Y-Z utilisée pour déplacer la sonde dans le sens vertical au-dessus de la surface et latéralement. Un circuit électronique de rétroaction était ensuite utilisé pour piloter la céramique piézo-électrique et ainsi garder le courant et la distance sonde-échantillon constante (Z). En outre, la céramique piézoélectrique était utilisée pour balayer la surface horizontalement (XY). En suivant sur XY et Z la position de la sonde, une image 3D de la surface était alors construite. La résolution de l'instrument de Young était néanmoins déterminée par les vibrations de l'instrument.

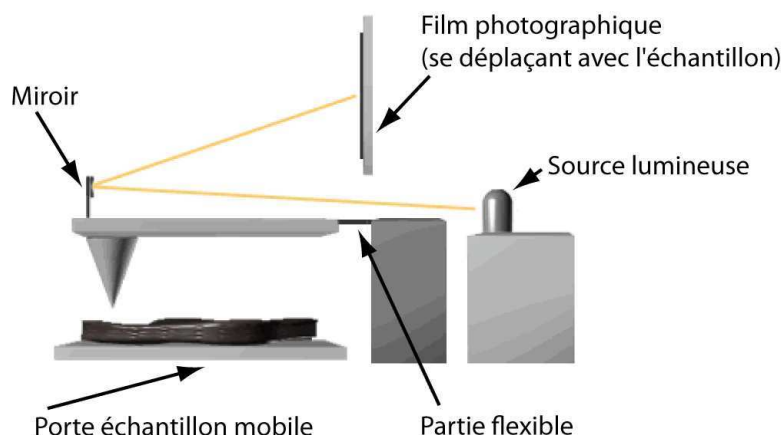


Figure 41 : Le profilomètre de Schmalz (1929)

En 1981, des chercheurs travaillant pour IBM, Gerd Binnig et Henrich Rohrer ont réussi à utiliser les méthodes exposées pour la première fois par Young pour créer le Microscope à Effet Tunnel (Scanning Tunneling Microscope STM) (Binnig *et coll.* 1982). Binnig et Rohrer ont ainsi démontré que si l'on contrôle les vibrations d'un instrument très similaire au « topographiner » de Young, il est possible de suivre le courant d'électrons tunnel entre une pointe et un échantillon (Figure 42a). Comme le courant tunnel est beaucoup plus sensible à la séparation pointe-échantillon que le champ d'émission, la sonde peut être utilisée pour balayer au plus près de la surface. De ce fait, les résultats obtenus étaient stupéfiants; ils étaient capables de discerner chacun des atomes de silicium d'une surface. Bien que le STM ait été tout de suite considéré comme une avancée fondamentale, ses applications étaient limitées car il ne fonctionnait que sur des échantillons conducteurs électriquement.

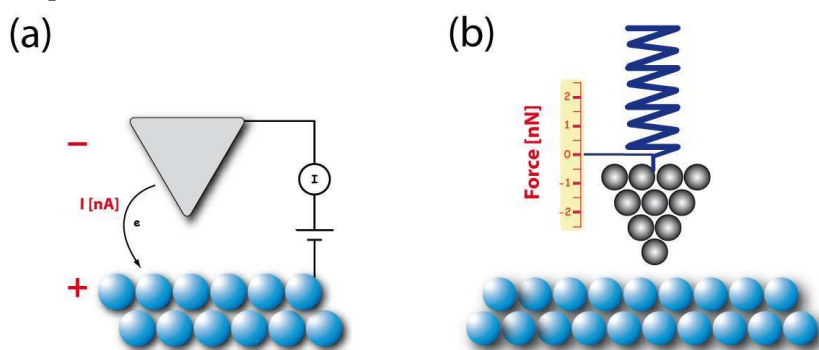


Figure 42 : Principe de la Microscopie à Effet Tunnel (STM) et de la Microscopie à Force Atomique (AFM)

(a) En microscopie à effet tunnel, on mesure le courant échangé entre la pointe et la surface et on en déduit la séparation pointe-surface. (b) En microscopie à force atomique, on mesure la force d'interaction et on en déduit la séparation pointe-surface.

Un grand progrès dans le monde de la profilométrie est survenu en 1986, lorsque Binnig, Quate et Gerber présentèrent le Microscope à Force Atomique (Binnig *et coll.* 1986). En utilisant une sonde ultra-fine montée au bout d'un cantilever, ce microscope pouvait atteindre de très hautes résolutions sur des échantillons isolants (Figure 42b). En effet, le mouvement du cantilever est maintenant gouverné par les 'forces atomiques' s'exerçant entre les atomes de l'extrémité de la pointe et ceux de la surface (répulsion coulombienne, forces de van der Waals, forces électrostatiques,...) et pouvait être suivi avec une sonde STM. Cependant, il est rapidement apparu qu'un bras de levier optique, similaire à la technique utilisée pour la première fois par Schmalz, pourrait être utilisé pour mesurer les mouvements du cantilever. Dans leur article initial, Binnig *et coll.* proposent que l'on puisse améliorer la technique en faisant vibrer le cantilever au-dessus de la surface (Binnig *et coll.* 1986). La première démonstration pratique de cette amélioration a été faite par Wickramsinghe *et coll.* en 1987 (Martin *et coll.* 1987).

2.1.2 Principe Général

Il existe actuellement différents types de microscope à force atomique spécialisés en fonction de leur application. Néanmoins, le principe général du microscope à force atomique reste identique. Une pointe de dimensions nanométriques située à l'extrémité libre d'un micro-levier ou cantilever est approchée au voisinage d'une surface au moyen d'un système de vis micrométriques jusqu'à une distance de l'ordre de quelques dizaines de microns. Afin de préserver la pointe, la fin de l'approche de la surface est gérée par un moteur pas à pas qui assure des déplacements verticaux de quelques dizaines de nanomètres par pas. Une fois la pointe engagée sur la surface, la formation d'une image est assurée par le déplacement sous la pointe de l'échantillon grâce à des céramiques piézoélectriques X-Y-Z. Les déflexions du levier sous l'action des forces qui s'exercent entre la pointe et la surface sont mesurées par un système de détection optique constitué d'un faisceau laser et d'une photodiodes à quatre quadrants. Le faisceau laser, centré sur l'extrémité supérieure du levier, est réfléchi vers les photodiodes qui délivrent une tension électrique proportionnelle à la déflexion du levier.

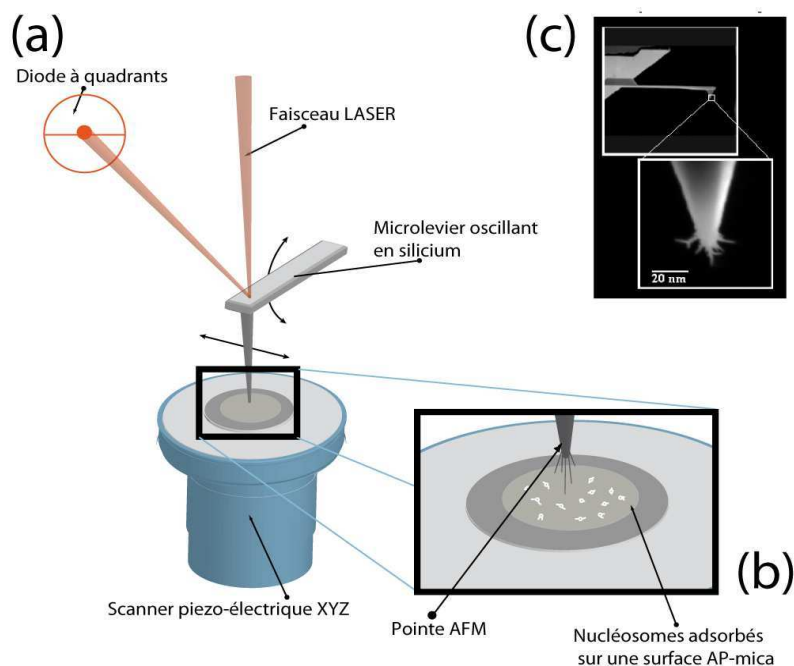


Figure 43 : Principe général du microscope à force atomique

(a) vue générale (b) zoom sur le contact pointe-surface (c) images en microscopie électronique d'un microlevier DLCS et de sa pointe

Lors de ce balayage un système de rétroaction permet de garder un paramètre de contrôle constant comme la déflexion du levier ou la hauteur du levier, la température du levier, etc... selon l'information recherchée. Dans la grande majorité des cas le paramètre de consigne/contrôle est la déflexion exercée sur le micro-levier et donc la force ressentie par ce dernier.

Le micro-levier est l'élément de détection central pour l'AFM (Figure 43). Il détermine la force qui est exercée sur l'échantillon pendant le balayage. En fonction de l'application et du mode d'imagerie utilisé, il peut être nécessaire d'utiliser des raideurs variant d'environ 100 N/m à 0,01 N/m. De plus, pour éviter les résonances à basse fréquence, réduire le bruit thermique et la force de traînée hydrodynamique il est avantageux de les rendre aussi petites que possible. La plupart des micro-leviers disponibles dans le commerce ont des longueurs de 50 à 300 μm et sont faits en silicium, oxyde de silicium, ou nitrures de silicium. Selon les cas, la forme du levier peut être rectangulaire ou triangulaire.

L'extrémité de la pointe est, elle aussi, très importante dans l'objectif d'obtenir des images à haute résolution. Dans notre cas nous utilisons des pointes en carbone diamant ayant un rayon de courbure final entre 1 et 3 nm. Ce type de pointe permet une haute résolution spatiale et également une très grande stabilité dans le temps de l'imagerie, ce qui est primordial lorsque l'on souhaite acquérir un grand nombre d'images pour chaque condition expérimentale (~ 300 images dans notre cas). La durée de vie de ce type de pointe permet même de comparer plusieurs conditions expérimentales avec la même pointe dans le même état (> 1000 images).

Dans la majorité des cas, on étudie les échantillons selon l'un des trois modes suivants : par un contact direct avec l'extrémité de la pointe (force répulsives – mode contact), ou bien en balayant la surface sans contact et en gardant la pointe séparée de l'échantillon par quelques nanomètres (forces d'attraction – mode non-contact), ou en touchant l'échantillon de manière périodique (force d'attraction et force répulsives - mode contact intermittent).

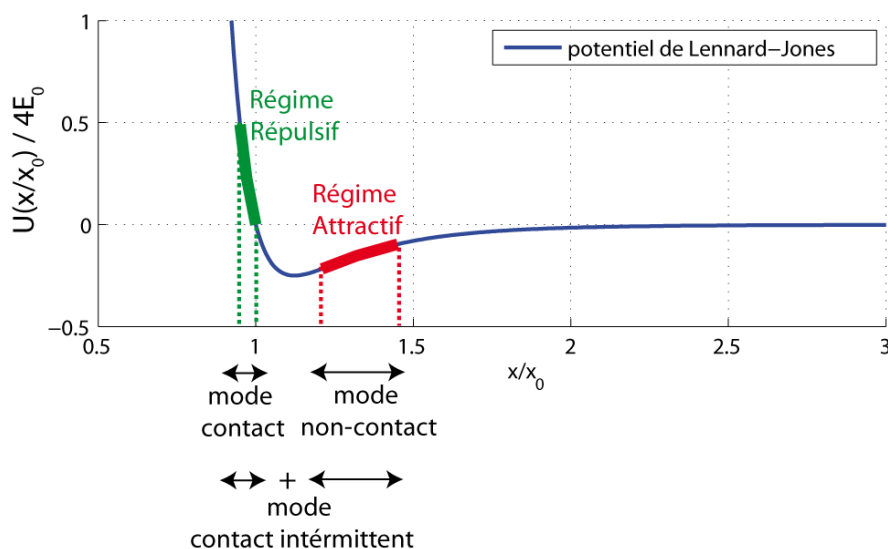


Figure 44 : Potentiel d'interaction pointe-surface et modes d'imagerie AFM

Potentiel de Lennard-Jones d'interaction entre la pointe et la surface montrant les différents régimes utilisés pour l'imagerie AFM : en mode contact, la pointe est en régime répulsif, en mode non-contact elle est en régime attractif. Dans le mode contact intermittent que nous utiliserons, la pointe tape la surface de manière transitoire, elle oscille entre les régimes répulsif et attractif.

Ces trois modes correspondent à trois régimes d'interactions entre la pointe et l'échantillon. En considérant que le potentiel d'interaction entre la pointe et la surface peut-être être décrit par un potentiel de Lennard-Jones, on peut représenter ces modes de l'AFM comme trois régions de la

distance d'interaction (Figure 44). En contact, la pointe est repoussée par l'échantillon : zone en x^{12} (où x est la séparation entre la pointe et la surface) du potentiel théorique. En non-contact, la pointe oscille dans la région attractive. En contact intermittent la pointe passe alternativement d'un régime en contact à un régime attractif.

2.1.2.1 Mode Contact

Dans ce mode de fonctionnement de l'AFM, la pointe exerce une force de frottement permanente sur l'échantillon. A force constante, c'est à dire à déflexion verticale constante du levier, on reconstruit ainsi la surface touchée lors de ce balayage. C'est encore aujourd'hui le mode le plus fréquemment utilisé avec le mode contact intermittent. Il est particulièrement simple à utiliser puisque le seul paramètre réglable est la force normale exercée sur l'échantillon. En analysant la déflexion latérale du levier il est également possible de remonter à la force de frottement latéral exercée sur l'échantillon et donc au coefficient de friction locale ($F_f = \mu \cdot F_n$, Loi de Coulomb où μ est le coefficient de frottement spécifique du matériau). Ceci permet d'accéder dans certains cas comme pour des polymères simples à la viscoélasticité locale en plus de la topographie (Noy *et coll.* 1997; Girasole *et coll.* 2007). Malheureusement la mesure du frottement local étant influencée par la courbure locale de l'échantillon, il est parfois difficile d'analyser les images de frottements ainsi obtenues pour des topographies accidentées. Ainsi, ce mode d'imagerie n'est pas utilisable pour les échantillons fragiles comme les biomolécules isolées du fait de la contrainte de cisaillement exercée par la pointe. En biologie ce type d'imagerie est par contre utilisé pour l'imagerie de cellules isolées (Hoh 1994) (Figure 45) ou dans certaines conditions particulières pour imager des protéines membranaires avec une très haute résolutions (Müller *et coll.* 1999) (Figure 46).

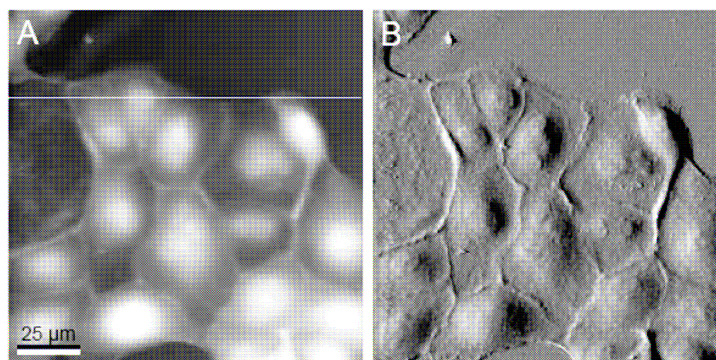


Figure 45 : Images AFM de topographie en mode contact d'assemblées cellulaires

(A) Image AFM de la topographie d'une assemblée de cellules visualisées en mode contact (B) Image AFM du signal d'erreur correspondant (\sim dérivée / x de l'image de topographie). (Hoh 1994)

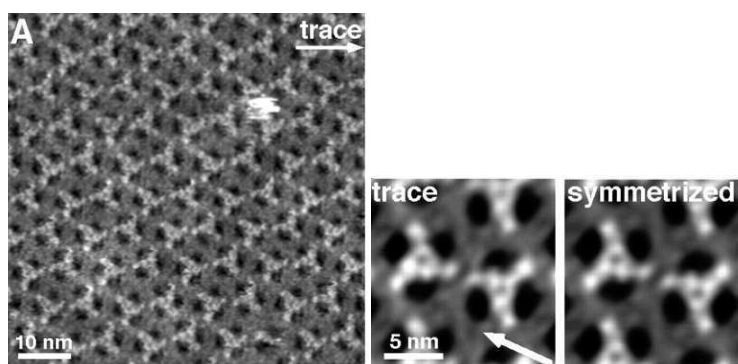


Figure 46 : Image AFM de topographie en mode contact de protéines membranaires

Surface periplasmique de porine OmpF. (Müller *et coll.* 1999)

Dans certains cas le mode contact est utilisé en ultravide pour diminuer les frottements et à très basse température (on l'appelle alors cryoAFM (Zhang *et coll.* 1996)) pour rigidifier les échantillons et augmenter le facteur de qualité du levier.

2.1.2.2 Mode Non-contact (Oscillant)

Dans ce mode, on fait osciller la pointe de manière à ce qu'elle reste dans le régime attractif de l'interaction avec la surface. Ceci conduit à la modification de l'amplitude d'oscillations libres et de la fréquence de résonance. Du fait de la dépendance de ces paramètres avec la séparation ils peuvent être utilisés comme paramètres de contrôle. Par exemple, si l'on garde l'un de ces paramètres constant on reste à une séparation constante de l'échantillon. En suivant le déplacement en Z , on obtient alors de la même manière que précédemment une image topographique de l'échantillon.

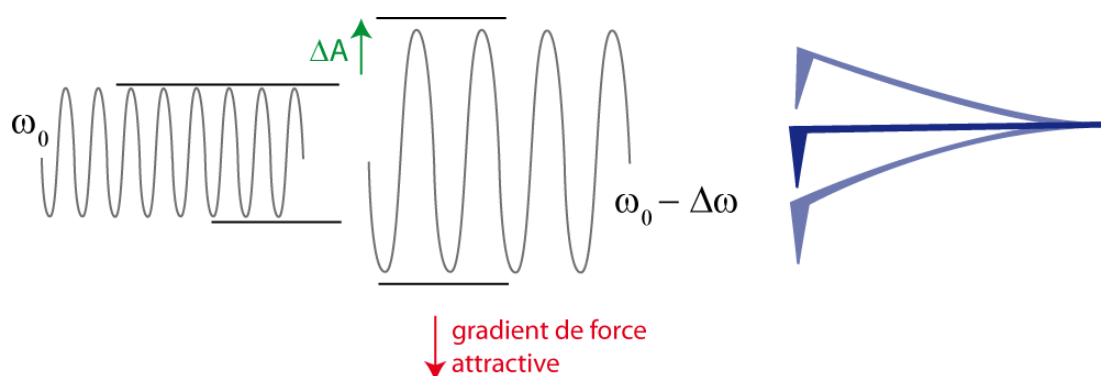


Figure 47 : Principe du mode non-contact

En mode non-contact, le levier oscille au-dessus de l'échantillon à sa fréquence de résonance. Lorsque la séparation pointe-surface est faible le levier ressent le gradient de force induit par la présence de forces attractives en surface de l'échantillon. Il s'ensuit un décalage $\Delta\omega$ de la fréquence de résonance et une augmentation ΔA de l'amplitude d'oscillation. Ces deux paramètres étant dépendants de la distance pointe-surface, ils sont utilisés comme paramètres de contrôle pour maintenir le micro-levier à une séparation constante de l'échantillon et pour reconstruire la topographie de sa surface.

Du fait de la faible portée des interactions entre la pointe et l'échantillon et de leur faible intensité ce type d'imagerie est utilisé uniquement pour des échantillons très plats (quelques nanomètres). Une application courante est par exemple l'imagerie à très haute résolution de surface atomique de cristaux (Figure 48).

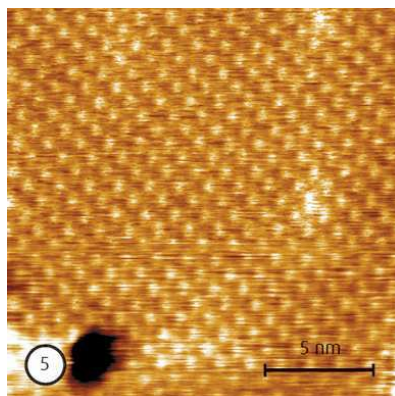


Figure 48 : Image AFM en mode non-contact d'un cristal de Silicium (111)

Réalisée par Juergen Koeble. Echelle Z : de 0 (en noir) à 1 Å (en blanc).

Pour mieux comprendre comment une force attractive est susceptible de modifier la réponse en fréquence du mico-levier considérons l'équation du mouvement de l'oscillateur :

$$\ddot{z} + 2\beta\dot{z} + \omega_0^2 z = \gamma \cos(\omega t) + \frac{f(D, t)}{m} \quad (1)$$

où z est la coordonnée de position de l'oscillateur, ici l'écartement de la pointe par rapport à sa position d'équilibre, ω_0 est la fréquence de résonance de l'oscillateur, γ représente l'amplitude de l'excitation à la fréquence ω , β est un terme de dissipation (le facteur de qualité est $Q = \omega_0 / 2\beta$) et m une masse effective pour l'oscillateur ($\omega_0 = \sqrt{k/m}$, où k est la raideur du cantilever). $f(D, t)$ est la force d'interaction pointe-surface, D la distance entre la surface et la position de repos de la pointe

Si l'on modélise l'influence de l'interaction entre la pointe et la surface sur la résonance de l'oscillateur on peut montrer pour des forces de faible intensité, que la courbe de résonance en amplitude est décalée suivant le gradient de force que subit la pointe :

$$\left(\frac{\omega}{\omega_0} \right)^2 = 1 - \frac{1}{k} \frac{\partial F}{\partial z}(D)$$

Tout se passe donc comme si la courbe de résonance était décalée en fonction du gradient de force ressentie au niveau de la pointe. En pratique, on mesure l'amplitude d'oscillation pour une fréquence ω_0 donnée. L'interaction (sans contact) avec la surface a donc pour effet dans ce cas de réduire l'amplitude d'oscillation. La variation d'amplitude d'oscillation est d'autant plus abrupte pour un décalage en fréquence (et donc un gradient de force) donné que la résonance du levier est abrupte. Le facteur de qualité $Q = \omega_0 / \Delta\omega$ qui définit la largeur de ce pic est donc prépondérante dans l'obtention d'un contraste élevé. Si l'on considère grossièrement que l'on ne peut résoudre un décalage en fréquence inférieur à $\Delta\omega$, on peut alors calculer le gradient de force $F'(D)$ minimum détectable. Pour $k \gg F'(D)$

$$\frac{\Delta\omega}{\omega_0} = 1/Q = F'(D)_{\min} / 2k$$

d'où :

$$F'(D)_{\min} = 2k / Q$$

On voit donc que l'on a intérêt en non-contact à choisir la raideur la plus basse avec le facteur de qualité le plus haut.

A.N. : Pour $k = 1 \text{ N/m}$, et $Q = 100$, on a $F'(D)_{\min} = 0.05 \text{ N/m}$ ce qui est de l'ordre de la raideur d'une liaison hydrogène ($k_H = 0.01 \text{ N/m}$)

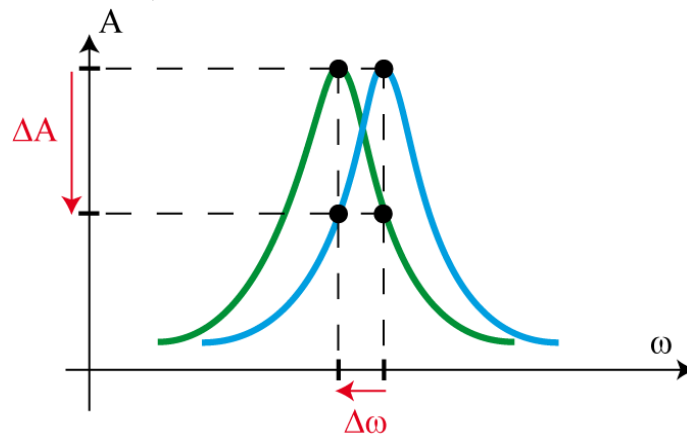


Figure 49 : Mode non-contact et décalage en fréquence

Lors de l'interaction de la pointe avec la surface le spectre de résonance du levier subit un décalage $\Delta\omega$ lié à l'intensité du gradient de la force subie par la pointe. En pratique, on détecte la variation de l'amplitude d'oscillation ΔA à une fréquence fixée (proche de la résonance).

Des mesures de force interfaciales à longue portée ont été faites par cette méthode résonnante linéaire. La technique de résonance est maintenant couramment utilisée pour obtenir des images électrostatiques ou magnétiques des surfaces. Rappelons qu'afin d'éviter un couplage avec la topographie, l'image en force électrique ou magnétique est acquise au cours d'un « survol » à altitude constante de la surface. L'estimation de la topographie est faite en mode Tapping.

2.1.2.3 Mode Contact Intermittent – Tapping

Intermédiaire entre les deux modes précédents ce mode-ci permet de suivre la topographie de l'échantillon aussi efficacement que le mode contact sans créer de contrainte de cisaillement tout comme le mode non-contact. Pour ce faire, on excite le levier hors contact de manière à ce que la pointe touche l'échantillon sur une faible partie de la période d'oscillation, créant ainsi un contact intermittent entre la pointe et la surface. En outre, de la même manière qu'en non-contact, on garde l'amplitude de l'oscillation constante lors du balayage de manière à conserver la force exercée par la pointe constante. L'interaction entre l'échantillon et la pointe étant plus complexe nous allons essayer avec un modèle simple de comprendre de ce qui se passe de cas.

Si la pointe vibre près de la surface et/ou si son amplitude est grande, une description au premier ordre de l'interaction n'est plus possible. L'oscillateur est non-linéaire et on peut s'attendre à des effets particuliers. En pratique, cependant, la déflexion reste quasi-sinusoidale. En fait, à cause du grand facteur de qualité de la résonance, les non-linéarités n'entraînent pas d'anharmonicité de la réponse, mais vont se manifester dans le type de dépendance de la réponse aux paramètres de commande et d'interaction. Reprenant l'équation (1), on recherche une solution permanente sous la forme : $x = A \cos(\omega t - \varphi)$. Dans ce cas l'interaction est une fonction périodique du temps que l'on représente par son développement en série de Fourier. L'harmonicité de la réponse conduit à ne conserver que les termes du premier ordre (ici encore, le terme constant est négligé) :

$$f(D, t) \approx \Phi(D, A) \cos(\omega t - \varphi) + \Psi(D, A) \sin(\omega t - \varphi)$$

où :

$$\Phi(D, A) + i\Psi(D, A) = \frac{\omega}{\pi} \int_0^{2\pi/\omega} f(D, t) e^{i(\omega t - \varphi)} dt$$

Après insertion de cette forme pour l'interaction, l'identification des termes en sinus et cosinus conduit aux deux relations :

$$A \cdot (\omega - \omega_0) = \gamma \cos(\varphi) + \frac{\Phi(D, A)}{m}$$

$$2A\beta\omega = \gamma \sin(\varphi) + \frac{\Psi(D, A)}{m}$$

Pour un modèle d'interaction et des conditions d'excitation données, ces relations déterminent l'amplitude A et la phase φ de la réponse. Pour illustrer la déformation des spectres de résonance dans le cas non-linéaire et non-dissipatif, nous allons étudier le cas d'une interaction de Van der Waals sphère-plan (Boisgard *et coll.* 1998) :

$$F(z) = -\frac{HR}{6} z^{-2}$$

où H est la constante de Hamaker. Ce type de force représenterait le cas où la pointe dont l'extrémité est assimilable à une portion de sphère de rayon R , est située à une distance de la surface de l'ordre de R . Le calcul du coefficient de Fourier $\Phi(D, A)$ donne :

$$\Phi(D, A) = \frac{HR}{3} \frac{A}{(D^2 - A^2)^{3/2}}$$

On peut exprimer l'équation de la résonance à l'aide des variables réduites :

$$u = \frac{\omega}{\omega_0}, \quad \tilde{A} = \frac{A}{A_r}, \quad \tilde{D} = \frac{D}{A_r}$$

avec $A_r = \frac{\gamma Q}{\omega_0^2}$ l'amplitude à la résonance en l'absence d'interaction et $X = \frac{HRQ}{3kA_r^3}$. X est Q fois le rapport de l'énergie potentielle de Van der Waals pour une distance A_r à l'énergie mécanique stockée dans le cantilever. On trouve la relation implicite :

$$u^2 + \left[Q \cdot (1 - u^2) - \frac{X}{(\tilde{D}^2 - \tilde{A}^2)^{3/2}} \right]^2 = \frac{1}{\tilde{A}^2}$$

La Figure 50 montre la déformation du pic de résonance du système lorsque la distance entre la surface et la position de repos de la pointe décroît. On a choisi $X = 1$, $Q = 400$, les différentes courbes correspondent à des distances réduites $\tilde{D} = 10, 1.4, 1.25, 1.15$.

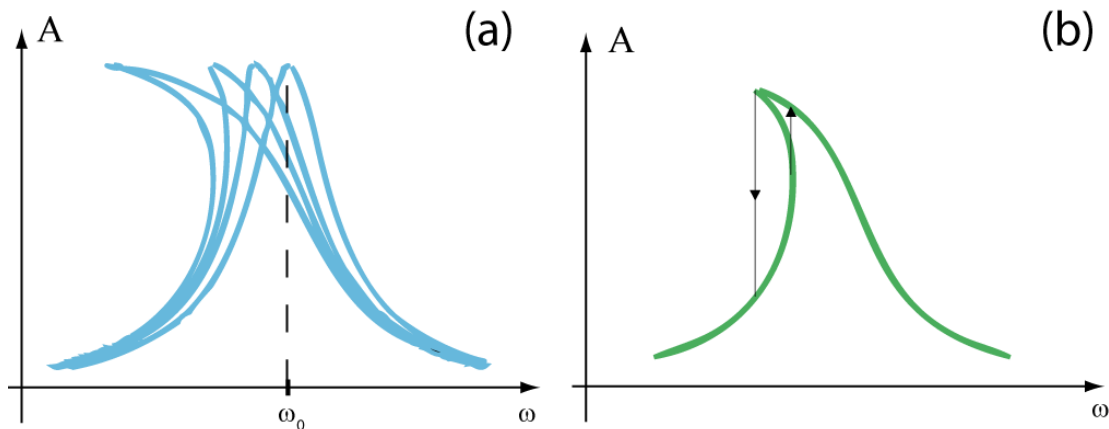


Figure 50 : Phénomènes non-linéaires et déformation de la courbe de résonance en mode contact intermittent

(a) Déformation du pic de résonance en fonction des distances réduites $\tilde{D} = 10, 1.4, 1.25, 1.15$. pour $X = 1$ et $Q = 400$, (b) Une hystérésis apparaît lors de l'enregistrement du spectre très déformé de l'oscillateur (ici $\tilde{D} = 1.25$).

Comme on le voit, la courbe de résonance est alors déformée ce qui peut donner lieu à des phénomènes non-linéaires. Il devient donc très complexe d'interpréter quantitativement les contrastes observés et de remonter à la mesure d'un gradient de force. En effet, comme nous le verrons lorsque nous aborderons les artefacts et limitations de l'AFM (section 2.1.3), les hauteurs mesurées peuvent être influencées en partie par le détail de l'interaction entre la pointe et le matériau considéré.

Nous utiliserons donc ce mode comme un outil d'imagerie uniquement en prenant garde d'utiliser des paramètres d'imagerie les plus constants et reproductibles possible pour limiter leur influence sur le contraste observé. On peut citer néanmoins de nombreuses études modélisant le phénomène de Tapping pour rendre compte des phénomènes non-linéaires observés lors des expériences d'AFM (Van Noort *et coll.* 1997; Kühle *et coll.* 1998; Pickering *et coll.* 1998; James *et coll.* 2001; Moreno-Herrero *et coll.* 2003). Nous reviendrons dans la partie 2.1.3 sur ces effets.

2.1.2.4 Autres Modes

Le fonctionnement de l'AFM, dans ces trois modes principaux, a depuis quelques années été complété par différents perfectionnements répondant à des applications particulières. Ces modes ont en commun l'intérêt que représente la pointe AFM vue comme une nano-sonde (mécanique, électrique, thermique ...). Sans rentrer dans les détails, on peut citer pour les mesures mécaniques la possibilité d'extraire en chaque point de l'image l'énergie d'adhésion entre la pointe et l'échantillon (Pulse Force Mode ou Force Volume (Heinz *et coll.* 1999)), pour les mesures électriques la possibilité d'extraire en chaque point le gradient électrostatique (*electric probe microscopy* ou EFM (Bachtold *et coll.* 2000), voir exemple sur la Figure 51) et pour les mesures thermiques la possibilité d'extraire en chaque point le spectre infrarouge (*photo-thermal micro-spectroscopy* ou PTMS (Hamliche *et coll.* 1999)).

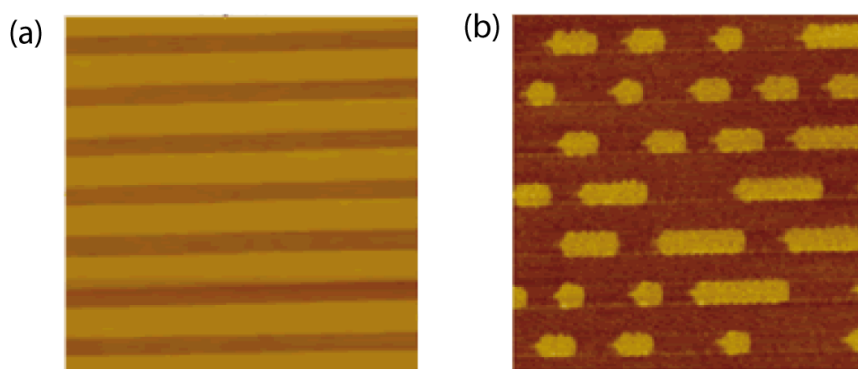


Figure 51 : L'AFM vu comme une nanosonde : l'EFM

L'EFM (c'est à dire 'Electric Force Microscopy') permet de mesurer le gradient de potentiel électrostatique. (a) Image AFM de topographie d'un CD-R/W. Echelle X/Y : 10 μm par 10 μm . Echelle Z : de 0 μm (marron foncé) à 1 μm (blanc). (b) Image EFM de la même surface. Echelle X/Y : 10 μm par 10 μm . On remarque que les zones chargées (en marron clair sur l'image EFM) ne correspondent à aucune modification de la topographie.

2.1.2.5 L'AFM et la spectroscopie de force

Bien que le travail présenté ici utilise l'AFM comme un outil d'imagerie, il existe une autre manière de faire fonctionner cet instrument, en l'utilisant comme un outil pour caractériser les forces entre la pointe et la surface un peu comme on le fait avec un SFA (Surface Force Apparatus). On appelle ce mode la spectroscopie de force. L'idée est de réaliser une approche puis un retrait de la pointe en enregistrant la déflexion normale du levier (Figure 52). On peut alors découper ces courbes en trois parties. La partie en contact où la déflexion varie linéairement avec la déformation du levier (pour un matériau purement élastique). La partie sans interaction où la déflexion est nulle et la partie en interaction sans contact.

La partie en contact permet de caractériser les propriétés viscoélastiques du matériau (module d'Young, viscosité). Quant à la partie en interaction hors contact, elle permet par exemple pour des surfaces chargées de remonter à la charge de surface, pour des polymères greffés à la surface de remonter à la longueur de persistance, et pour des protéines greffées de déterminer le chemin énergétique de dépliement.

Un nombre croissant d'études utilisent l'AFM dans cette optique pour accéder à la structure et à la dynamique de biomolécules (Merkel *et coll.* 1999; Janovjak *et coll.* 2008)

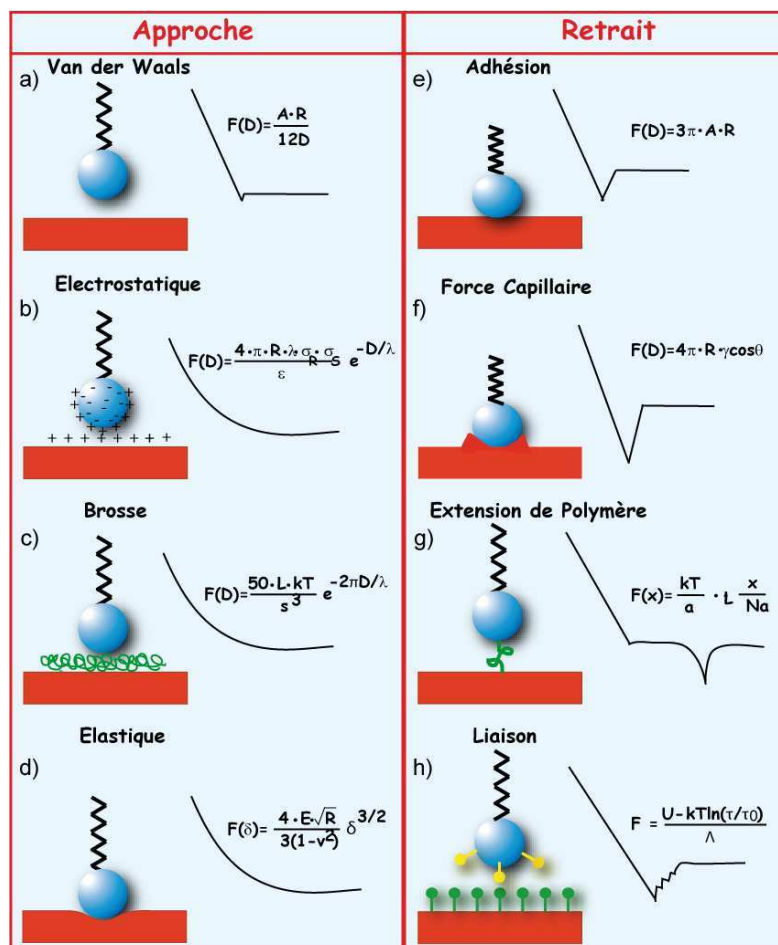


Figure 52 : Courbes d'approche-retrait et types d'interaction pointe-surface

a) Cas idéal où seule la force de Van der Waals est présente en l'absence d'autres forces. b) Répulsion électrostatique de double couche observée en solution pour des surfaces chargées. c) Répulsion entropique liée à aux mouvements thermiques d'une brosse de polymère accrochée sur la surface. d) courbe d'indentation dans un échantillon élastique. Dans ce cas le point de contact réel correspond à l'endroit où la courbe commence à s'infléchir. e) Force d'adhésion entre la pointe et la surface en l'absence de contaminants (typiquement dans le vide). f) force capillaire liée à la présence d'une fine couche d'eau en surface d'échantillons hydrophiles comme le mica. g) Force liée au dépliement puis au détachement d'un polymère accroché à la fois à la pointe et à la surface. h) Force liée au décrochement d'un couple ligand (associé à la pointe) - récepteur (lié à la surface) comme par exemple le couple biotine-streptavidine. D'après (Heinz *et coll.* 1999).

2.1.3 Artéfacts et limitations de l'AFM en imagerie

2.1.3.1 Dérive thermique et fluage piézo-électrique

La partie active lors du balayage de la surface par la pointe est le scanner en céramique piézo-électrique PZT (pour Titano-Zirconate de Plomb). Dans ce type de céramiques une différence de potentiel appliquée de part et d'autre de l'échantillon induit une dilatation selon ce même axe. Cet élément permet de positionner l'échantillon à trois dimension par rapport à la pointe avec une précision de l'ordre du nanomètre .

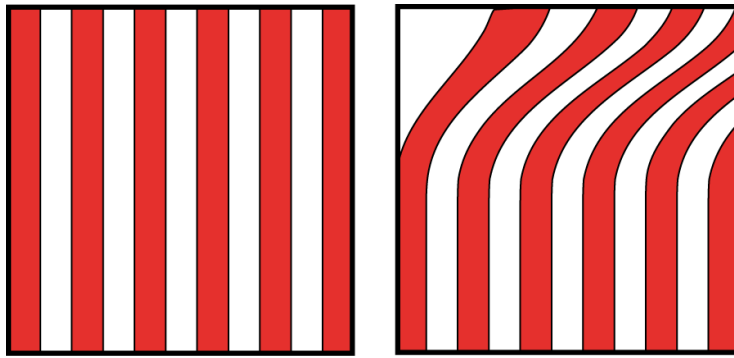


Figure 53 : Dérive piézoélectrique et déformation des images AFM

(à gauche) schéma représentant l'image AFM de topographie d'une surface formée par une série de motifs verticaux. (à droite) schéma représentant l'image AFM de topographie de la même surface en présence d'une dérive piézoélectrique selon (Ox) allant en s'atténuant. La direction de balayage rapide est (Ox) donc l'axe lent est (Oy).

Bien que très précis, ce phénomène de couplage entre différence de potentiel imposée et dilatation est un phénomène largement non linéaire et assez lent. Nous verrons plus bas l'importance de calibrer et de compenser les non-linéarités du système mais avant cela nous allons considérer l'effet de la température et d'une chute de potentiel aux bornes de la céramique sur sa réponse en dilatation.

Le système piézo-électrique est très lent à thermaliser. Les constructeurs considèrent que le temps de mise à température du système est supérieur à l'heure. Cela veut dire que pendant ce temps la température de la céramique change. La dilatation étant, elle aussi, couplée à la température on observe une dérive thermique en X,Y et Z du système piézo. Il est donc nécessaire d'attendre au moins une heure de balayage pour avoir des échelles X,Y et Z correctes.

De la même manière l'application d'un forte rampe de tension lors d'un changement de zone par exemple conduit à une réponse assez lente (de l'ordre de la minute pour une centaine de volts). Ceci entraîne que lors d'un déplacement en X-Y il est nécessaire d'attendre au moins une minute avant d'obtenir des échelles X et Y correctes. Ces limites conduisent à rallonger fortement la durée des expériences.

2.1.3.2 Non-linéarité piézo-électrique et couplage X-Y-Z

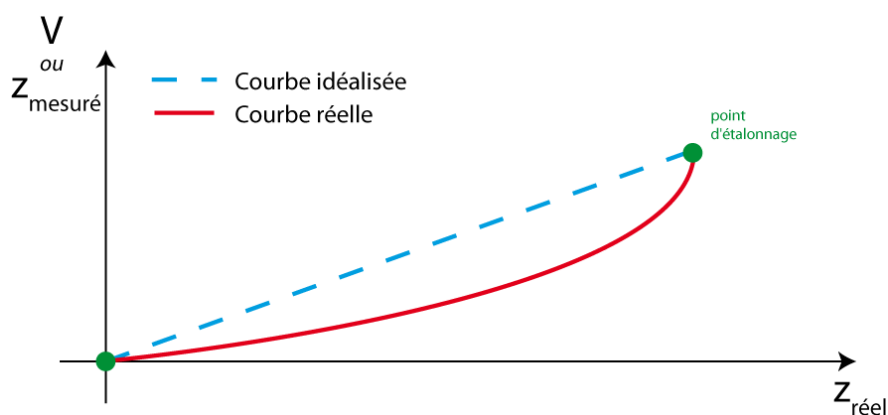


Figure 54 : Etalonnage de la mesure en Z et non-linéarité

Dans le cas idéal (en bleu) la mesure d'un seul point d'étalonnage (en vert) permet de connaître la relation entre V (ou $Z_{\text{mesuré}}$) et $Z_{\text{réel}}$. Néanmoins la présence de non-linéarité (en rouge) et de couplage entre Z,X et Y conduit à la nécessité d'un étalonnage pour plusieurs valeurs de V et différentes orientations de balayage.

La réponse en tension du tube piézo-électrique est non-linéaire et il existe un couplage entre les déformations dans les différentes directions. En outre, la céramique étant susceptible de vieillir (fluage) il convient de déterminer les paramètres de couplages entre V, X, Y et Z régulièrement. Pour ce faire, on calibre l'AFM en balayant un échantillon-test (une grille de calibration) selon différentes directions de balayage (Figure 54). On en déduit les valeurs de ces couplages.

2.1.3.3 Résolution en X,Y

La résolution latérale de l'AFM n'est pas imposée par le système piézo ou l'électronique du système mais par la pointe elle-même. En effet, comme le montre la Figure 55 il est impossible pour la pointe d'accéder à certaines zones de l'échantillon. Il en résulte un élargissement apparent des objets et une déformation des zones fortement courbées.

Considérons la pointe comme une boule de rayon r montée au sommet d'un cône de demi-angle θ (Figure 55). En cherchant le contact entre cette pointe et un objet de hauteur h on peut montrer que l'élargissement w vaut :

$$\begin{cases} \text{Si } h > R(1 - \sin(\theta)), & w = R + (h - R) \cdot \tan(\theta) \\ \text{Si } h < R(1 - \sin(\theta)), & w = R \cdot \sqrt{1 - \left(1 - \frac{h}{R}\right)^2} \end{cases}$$

A.N. : Si l'on considère que $\theta = 20^\circ$ et $R = 3 \text{ nm}$, on a dans le cas de l'ADN, $h = 2 \text{ nm}$ et donc $w = 2.8 \text{ nm}$. Pour le NCP, $h = 5.5 \text{ nm}$, donc $w = 3 \text{ nm}$, soit un diamètre apparent de 17 nm , ce qui correspond comme nous le verrons dans la partie 3 à la dimension mesurée expérimentalement pour un nucléosome.

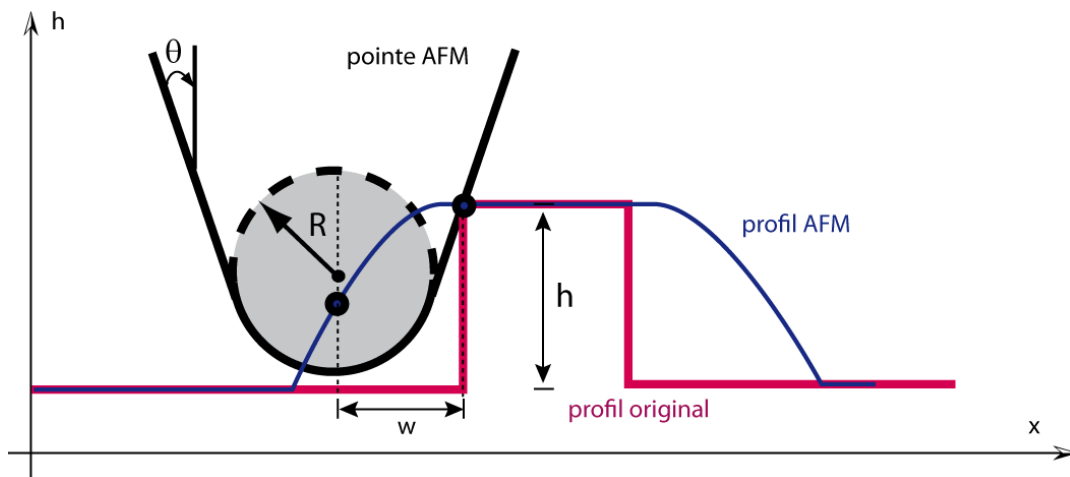


Figure 55 : Dilatation par la pointe AFM et élargissement des objets

Le balayage de la pointe AFM conduit à un élargissement apparent $2w$ des objets visualisés. On peut le déterminer en cherchant le point de contact entre le profil réel et la pointe, modélisée ici par une sphère de rayon R , montée sur un cône de demi-ouverture θ .

Nous verrons dans la partie '2.2.Analyse d'images' que l'on peut rapprocher ce phénomène de celui de dilatation morphologique et que cette opération est non inversible. La résolution de l'AFM dans notre cas est donc à peu près le rayon de la pointe soit 3 nm pour un événement unique.

2.1.3.4 Résolution en Z

Pour estimer la résolution en Z de notre système, on peut penser tout d'abord à deux types de bruits principaux : le bruit de photons sur le détecteur à 4 quadrants et le bruit thermique du levier.

Pour estimer le premier, considérons l'étude de Putman *et coll.* en 1992 (Putman *et coll.* 1992). Soit N_{tot} le nombre de photons reçus par le détecteur en une seconde et t le temps d'acquisition. Pour un faisceau laser de diamètre D_0 focalisé par une lentille de focale f , on a un diamètre apparent du faisceau, D_{sd} , tel que : $D_{sd} = 4\lambda f / \pi D_0$. Un déplacement de l'extrémité du micro-levier d'une hauteur Δz entraîne une rotation du micro-levier et donc implique un déplacement du spot sur le détecteur d'une distance Δs telle que : $\Delta s = 2f\Delta z / l$. Finalement en tenant compte du caractère gaussien du faisceau on a donc une variation du nombre de photon sur détecteur ΔN et un rapport signal sur bruit SNR tels que :

$$\Delta N = tN_{tot} 2\sqrt{2\pi} \frac{D_0}{l} \frac{\Delta z}{\lambda}$$

et

$$SNR = \frac{\Delta N}{\sqrt{tN_{tot}}} = \sqrt{8\pi tN_{tot}} \frac{D_0}{l} \frac{\Delta z}{\lambda}$$

A.N : En calculant cette valeur avec les paramètres classique des détecteurs et des lasers utilisés il ont montré qu'on aboutit à une amplitude de bruit proche de $A_{RMS} \sim 0.1 \text{ \AA}$.

Une autre source de bruit est la réponse du micro-levier au bruit thermique. Loin d'être négligeable le bruit thermique devient important pour des leviers très fins. Si l'on considère le mouvement global du levier soumis à l'agitation thermique on peut appliquer le théorème d'équipartition de l'énergie. Selon ce théorème chaque degré de liberté du système d'un système à température T correspond à une énergie de kT . Si l'on considère que le levier peut être assimilé à un pendule simple il y a équipartition de l'énergie en l'énergie cinétique et l'énergie potentielle. On a donc :

$$\frac{1}{2} k \cdot \langle z^2 \rangle = k_B T \text{ et } A_{RMS} = \sqrt{2k_B T/k}$$

Pour les raideurs utilisées en AFM ce type de bruit est prépondérant d'un ordre de grandeur par rapport au bruit précédemment cité. En effet,

A.N.: Pour $k \sim 1 \text{ N/m}$, $A_{RMS} \sim 1 \text{ \AA}$

Même s'il est possible de vérifier cette valeur de bruit sur des échantillons atomiquement plats cette limite est inatteignable pour des échantillons de biomolécules. En effet, dans ce cas il faut prendre en compte différents facteurs comme le bruit thermique des biomolécules elles-mêmes et les propriétés viscoélastiques très différentes entre différentes zones de l'image. En effet, comme nous l'avons vu dans le mode contact intermittent, la forme du pic de résonance est très dépendante des propriétés locales de l'échantillon. En conséquence, lorsque la pointe de l'AFM passe d'une zone très rigide/peu adhésive à une zone très molle/adhésive la réponse fréquentielle du levier change. Sans rentrer dans les détails, on peut montrer que l'AFM a tendance dans ce cas à sous-estimer la hauteur des parties molles par rapport au parties dures, à surestimer la hauteur des objets adhérents à la pointe, ou encore à sous-estimé la hauteur des objets chargés de la même manière que la pointe (Van Noort *et coll.* 1997; Kühle *et coll.* 1998; Pickering *et coll.* 1998; James *et coll.* 2001; Moreno-Herrero *et coll.* 2003) (Figure 56). Ceci à pour conséquence dans notre cas de sous estimer la hauteur de l'ADN $h_{réel} = 2 \text{ nm}$, $h_{AFM} \sim 0.6 \text{ nm}$ ou celle du nucléosome $h_{réel} = 5.5 \text{ nm}$, $h_{AFM} \sim 2 \text{ nm}$.

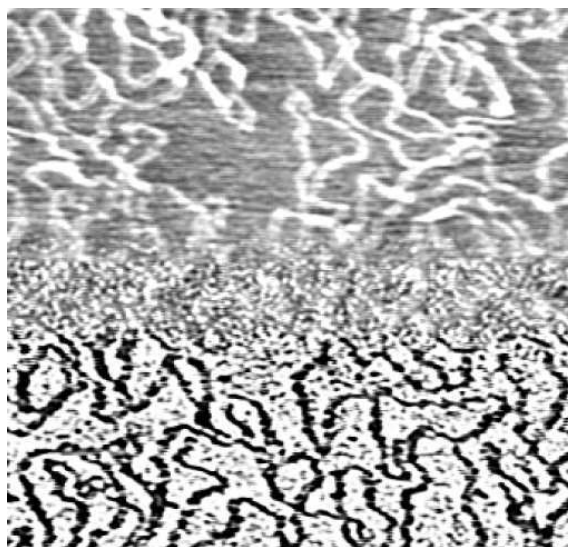


Figure 56 : Contraste AFM et amplitude de l'oscillation

Images AFM de topographie d'ADN. Echelle X/Y : Echelle Z : de 0 nm (noir) à nm. Du haut vers le bas de l'image effet de la diminution de l'amplitude de consigne (et donc de l'augmentation de la force d'interaction pointe-surface) sur le contraste de l'image AFM de topographie. On remarque une inversion du contraste entre le haut et le bas de l'image due à la présence d'un phénomène d'adhésion pointe-surface. Cette interaction spécifique induit un retard de phase lors de l'oscillation et conduit à une mauvaise évaluation des hauteurs par le contrôleur AFM. (Van Noort *et coll.* 1997)

Les mesures faites en AFM sur des biomolécules déposées sont donc très précises de manière relative mais souvent complexes à interpréter de manière absolue. Dans notre cas nous éviterons donc d'interpréter la valeur absolue des hauteurs observées

2.2 Analyse d'images et AFM

Le traitement automatisé des images issues du microscope à force atomique permet de traiter une grande quantité de données (jusqu'à 300 images par série dans notre cas soit plus de 1500 mono-nucléosomes) dans un temps relativement bref (5 ou 6 heures de traitement par série sur un PC de bureau classique). Elle permet aussi de mesurer les paramètres d'intérêts par une méthode qui ne dépend pas de l'œil de l'expérimentateur. Cette technique est néanmoins plus lourde car il faut prévoir à priori tous les cas susceptibles d'apparaître lors de l'analyse des images et plus sujet à artefacts car l'utilisateur n'intervient qu'au deux bouts de la chaîne. Des études précédentes ont par exemple extrait d'images AFM (mais de manière semi-automatique) la trajectoire de molécules d'ADN absorbées sur du mica (Rivetti *et coll.* 2001).

Nous avons choisi, pour cette étude, de traiter nos images de manière totalement automatisée et en ayant le moins possible de pré-requis sur la structure du nucléosome. C'est pourquoi, nous avons utilisé des outils robustes basés sur l'analyse morphologique. Ils nous ont permis de sélectionner les objets à considérer et de mesurer leurs paramètres d'intérêts en ne se donnant que des critères de taille et d'aire et sans introduire de biais liés au faible nombre de pixels en jeu.

Dans cette section, nous allons tout d'abord présenter les bases de l'analyse morphologique puis nous détaillerons les programmes développés à partir de ces outils. Je tiens à préciser à cette occasion, que les outils et le travail présentés ici ont été initialement développés avec l'aide précieuse de Philippe St-Jean.

2.2.1 Les outils morphologiques

L'analyse morphologique est une méthodologie de traitement d'image née en France dans les années 60 et de plus en plus utilisée depuis lors (Serra 1983; Matheron 1988; Serra 1988; Soille 1999). Elle est aujourd'hui largement acceptée comme une boîte à outils très utile avec un nombre varié d'algorithmes comme la segmentation, la reconnaissance de forme ou la mesure de distances complexes et dans des domaines tels que la médecine, les sonars, la robotique, la reconnaissance d'empreintes digitales ou encore la compression d'images (Gonzales *et coll.* 1987). A priori toute application s'intéressant à des images partageant un ensemble bien défini de caractéristiques (par exemple la taille et la forme de l'objet à détecter) est une bonne candidate pour cette méthodologie.

L'approche morphologique consiste à considérer une image binaire ou en nuance de gris comme un relief topographique ce qui en fait la méthode d'analyse naturelle pour les images AFM. Les opérateurs morphologiques permettent ensuite de modifier ces surfaces dans le domaine spatial en utilisant des sondes appelées éléments structuraux (Figure 57). A partir des opérations de bases que sont l'érosion et la dilatation on peut alors construire des opérateurs plus complexes comme la fermeture (dilatation puis érosion) ou l'ouverture (érosion puis dilatation). Ces outils permettent de travailler en parallèle sur plusieurs objets et donc d'éviter les boucles dans les algorithmes d'où un gain de temps important. La suite ce chapitre présente dans le cas d'une image binaire puis en nuance de gris comment construire et utiliser ces opérateurs morphologiques du plus simple au plus complexe.

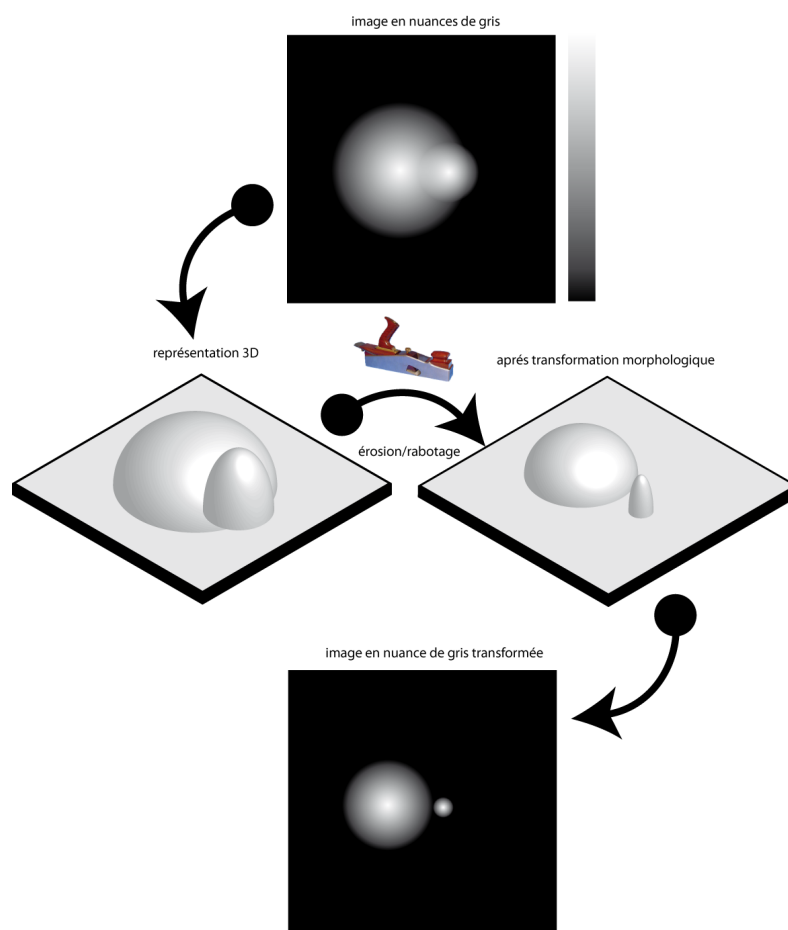


Figure 57 : L'érosion morphologique vue comme une modification de la topographie

Dans le cadre de l'analyse morphologique, on peut représenter les opérations sur l'image comme des opérations de modification de la topographie de la surface associée. Ainsi, l'érosion peut être vue comme l'action d'un outil rabotant la surface de l'objet.

2.2.1.1 Les éléments structurants, l'image binaire

Avant de parler des opérateurs en tant que tels, nous allons définir les objets étudiés (Figure 58) : le pixel, l'image, l'objet binaire et la sonde utilisé i.e. l'élément structurant.

Les images AFM sont formées de pixels carrés formant un maillage carré lui aussi. Deux pixels de l'image seront considérés comme connectés lorsqu'ils ont un coté en commun (pour la connectivité 4) ou lorsqu'ils ont soit un coté en commun soit un sommet en commun (pour la connectivité 8).

Formellement, on appelle image binaire I la transformation d'un sous-ensemble de Z^2 (de forme carrée et de N pixels dans le cas des images AFM) vers $\{0,1\}^N$. On peut donc voir simplement une image binaire comme une fonction caractéristique ou masque qui définit quelles sont les zones d'intérêts de l'image (0 = 'hors de la zone d'intérêt', 1 = 'dans la zone d'intérêt'). Du point de vue de l'analyse morphologique on verra une image binaire comme une surface à deux niveaux (0 pour le fond et 1 pour les zones élevées) modifiable par les opérateurs qui vont jouer le rôle de terrassiers en la modifiant. L'objet binaire est un sous-ensemble compact ou « connecté » de Z^2 dont la valeur par l'application I vaut 1 en tout point. L'image peut donc aussi être vue comme une collection d'objets binaires disjoints.

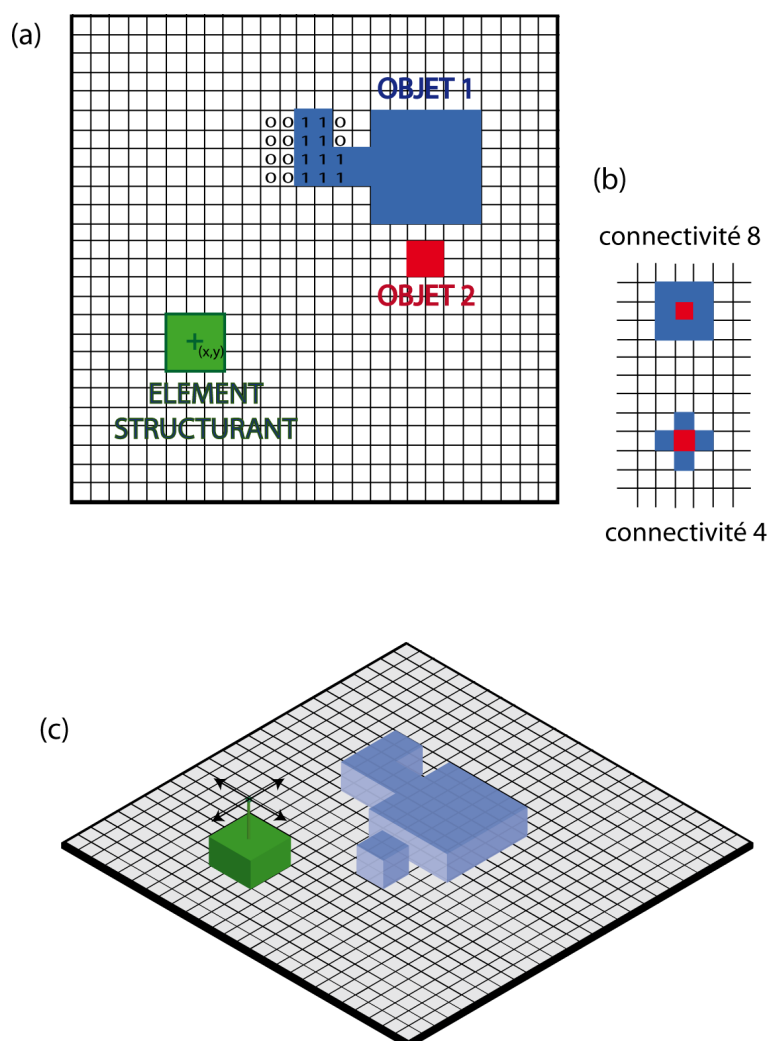


Figure 58 : Image, objet binaire et connectivité

On appelle élément structurant un sous-ensemble B de \mathbb{Z}^2 généralement petit par rapport à la taille de l'image I à traiter et de forme relativement simple (un carré ou un disque par exemple) que l'on translate sur l'image I et dont la relation avec l'image I est étudiée en chaque point. A chaque position de l'élément structurant, on regarde s'il touche ou s'il est inclus dans l'ensemble initial. En fonction de la réponse, on construit un ensemble de sortie. On obtient ainsi des opérateurs de base qui sont relativement intuitifs.

2.2.1.2 La translation

Soit B , sous-ensemble de \mathbb{Z}^2 , on appellera B_x la translation de B au point x de \mathbb{Z}^2 i.e. :

$$B_x = \{b + x \mid b \in B\}$$

Comme illustré sur la Figure 59, la translation est une opération simple qui nous sera utile pour définir l'opération morphologique de dilatation.

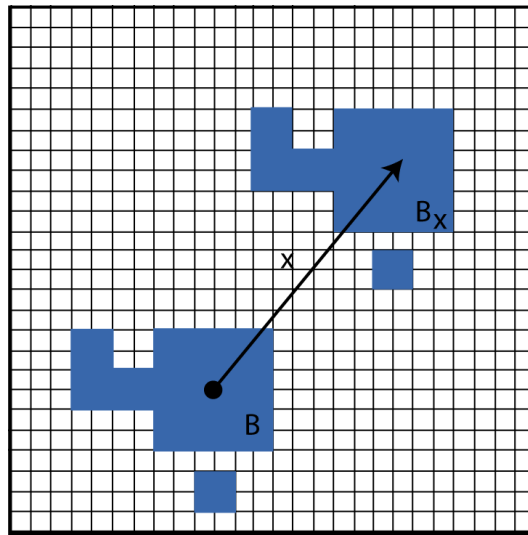


Figure 59 : Translation morphologique

2.2.1.3 La dilatation

Appelons A un objet binaire de I et B un élément structurant (B est largement plus petit que A). On appelle dilatation de A par B la transformation d'un sous-ensemble de \mathbb{Z}^2 dans un sous-ensemble de \mathbb{Z}^2 qui associe à A l'objet binaire $A_{dilaté}$ défini tel que :

$$A_{dilaté} = \{x \in \mathbb{Z}^2 \mid A \cap B_x \neq \emptyset\}$$

Un formalisme utile introduit par Minkowski en 1901 permet de présenter cette opération de manière compacte même si elle est moins intuitive. Selon sa définition, la dilatation est une addition sans translation telle que pour des éléments structuraux symétriques par rapport à l'origine, on a :

$$A_{dilaté} = A \oplus B = \{x + b \mid x \in A, b \in B\}$$

Comme les éléments structuraux que nous allons utiliser sont des disques nous ferons donc notre cette notation.

La dilatation par un disque a pour effet d'augmenter la taille des objets selon la taille du disque, de relier entre elles les composantes proches et de boucher les petits trous (plus petits que l'élément structurant) (Figure 60). Nous verrons plus loin que, dans le cas en nuances de gris, cette opération correspond formellement à l'action réalisée par une pointe AFM lorsqu'elle balaye un échantillon, sa taille fine ne lui permettant pas de décrire la surface à une échelle plus petite que la taille de la pointe.

2.2.1.4 L'érosion

De la même manière, appelons A un objet binaire de I et B un élément structurant (B est largement plus petit que A). On appelle érosion la transformation d'un sous-ensemble de Z^2 dans un sous-ensemble de Z^2 qui associe à A l'objet binaire $A_{\text{érodé}}$ défini tel que :

$$A_{\text{érodé}} = \{x \in Z^2 \mid B_x \in A\}$$

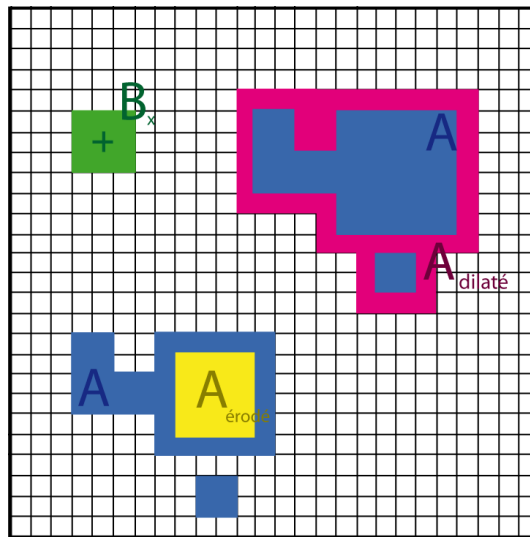


Figure 60 : Erosion et dilatation morphologiques

A l'opposé de la dilatation, l'érosion est donc une soustraction (de Minkowski) et pour les éléments structurants symétriques par rapport à l'origine on a

$$A_{\text{érodé}} = A \ominus B = \{x \mid \forall b \in B, x+b \in A\}$$

L'érosion par un disque a les effets suivants (Figure 60): l'objet est diminué selon la taille de l'élément structurant, les composantes connexes de l'objet plus petites que l'élément structurant sont supprimées, les parties des objets reliées par des « isthmes » plus fins que l'élément structurant sont déconnectées. D'un point de vue morphologique, l'élément structurant creuse les plateaux formés par les objets binaires comme pourrait le faire un rabot en enlevant les points du contour qu'il touche.

2.2.1.5 La fermeture et l'ouverture

L'érosion et la dilatation sont les deux opérateurs de base à partir desquels nous allons maintenant construire les outils utilisés pour notre analyse d'image. Considérons tout d'abord les opérateurs d'ouverture et de fermeture.

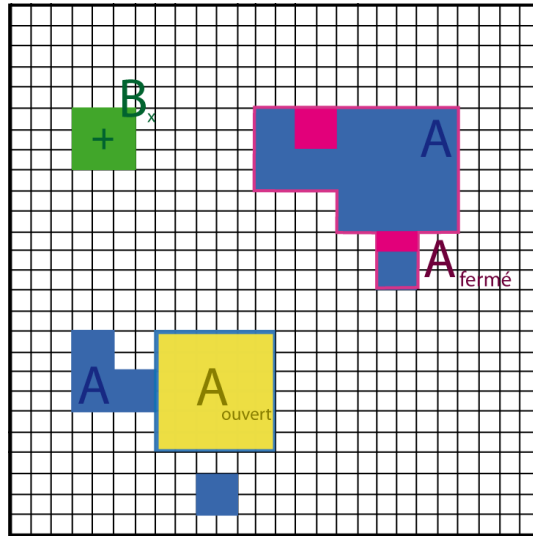


Figure 61 : Ouverture et fermeture morphologiques

Soit I un élément structurant et A un objet binaire :

$$A_{ouvert} = (A \ominus B) \oplus B$$

$$A_{fermé} = (A \oplus B) \ominus B$$

La fermeture permet de joindre des parties de l'objet distant de moins de la taille de B . Néanmoins elle n'augmente pas l'aire de l'objet. Nous l'utiliserons donc pour « lisser » le contour de nos objets binaires après seuillage.

2.2.1.6 La distance et dilatation géodésique

L'approche morphologique permet également de mesurer des distances. Soit A et A' (avec $A \subseteq A'$) deux objets binaires et B un objet structurant. Nous allons calculer le chemin le plus court d'un point du contour de A à un point quelconque de A' (hors de A). La distance ainsi définie est nommée distance géodésique car elle est contrainte à un espace A' .

Considérons tout d'abord la dilatation de A par B à l'intérieur de A' ou dilatation géodésique

$$A_{dilaté\ géodésique} = (A \oplus B) \cap A'$$

Si l'on choisit A d'une taille suffisamment petite, la dilatation géodésique revient exactement à une dilatation simple. Néanmoins pour des objets A ou des éléments structurants B de grande taille, on voit que la dilatation va être en quelque sorte rectifiée par l'intersection avec A' . Le front de la dilatation est contraint de se propager dans un guide d'onde défini par A' . Si l'on itère cet opérateur tout se passe comme si on propageait un front d'onde à partir du contour de A jusqu'au contour de A' . Le nombre d'itérations nécessaire pour atteindre un point donné de A' hors de A est en quelque sorte le temps mis par ce front pour atteindre le point en question.

En pratique, on calcule cette distance en chaque point de $A' \cap \text{non}(A)$. Pour ce faire, on itère la dilatation géodésique à partir de A jusqu'à ce que chaque point du contour de A' ait rencontré le front de dilatation (idempotence de l'opération). Soit N le nombre d'itérations i nécessaires pour atteindre cet objectif et soit x un point de A' hors de A , on peut alors montrer que la distance géodésique de x à A vaut :

$$d_{\text{géodésique}}(x|A) = N - \sum_i^N ((A \oplus B) \cap A')^{(i)}$$

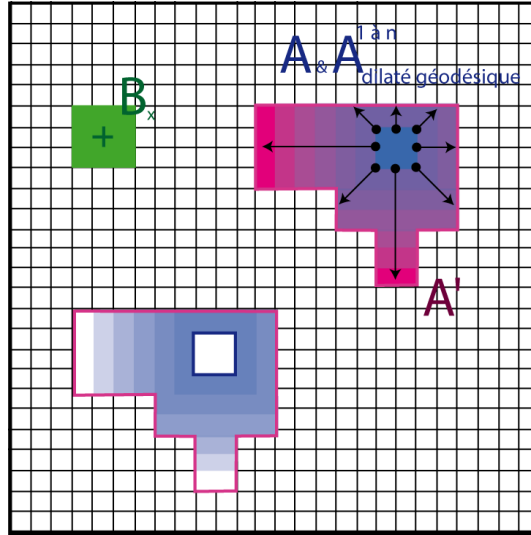


Figure 62 : Dilatation et distances géodésiques

Nous utiliserons cette distance géodésique pour mesurer les distances à l'intérieur du nucléosome en faisant une approximation pseudo-euclidienne (Serra 1983).

$$d_{\text{finale}} = (\sqrt{2} - 1) \cdot d_4 + (2 + \sqrt{2}) \cdot d_8$$

où d_4 est la distance géodésique en connexité 4 et d_8 celle en connexité 8.

2.2.1.7 Le squelette, la transformation tout ou rien et l'amincissement

Une autre opération que l'on peut effectuer à partir des opérateurs morphologiques est l'extraction du squelette d'un objet. Formellement, le squelette d'un objet binaire est l'ensemble des centres des boules ouvertes maximales incluses dans cet objet. Plus simplement, on peut aussi le définir comme une représentation simplifiée de l'objet de départ que l'on souhaite intuitivement compacte (lignes fines centrées), homotopique à l'objet de départ (même nombre de composantes connexes et même nombre de trous), et inversible. Dans le cas d'images discrétisées, la propriété d'inversibilité doit néanmoins être abandonnée. En ce qui nous concerne, la squelettisation permettra de déterminer la courbe passant au milieu des bras ADN de nos mono-nucléosomes avec une très bonne précision et sans dépendre des petites irrégularités du contour de l'objet.

Du fait de ces propriétés, la squelettisation permet de compenser les effets de la dilatation par la pointe de l'AFM, elle résout en effet pour des objets simples le problème inverse de cette opération. Différentes méthodes permettent d'obtenir le squelette d'un objet binaire donné. Nous présentons pour exemple la plus simple qui utilise la transformation en tout ou rien (ou 'hit or miss transform').

Soit A un objet binaire de I et B et B' deux éléments structurants. La transformation en 'tout ou rien' est la transformation d'un sous-ensemble de Z^2 dans un sous-ensemble de Z^2 qui à A associe $A_{\text{tout ou rien}}$ défini tel que :

$$A_{\text{tout ou rien}} = A \ominus B \cap \text{non}(A) \ominus B'$$

L'opérateur d'amincissement est alors défini par :

$$A_{\text{aminci}} = A - A_{\text{tout ou rien}}$$

Un choix idoine d'éléments structurants permet ainsi 'd'éplucher' l'objet à chaque itération de cet opérateur qui, à la différence de l'érosion, ne se termine pas à terme par une disparition de l'objet de départ mais l'obtention d'un objet d'épaisseur unitaire ayant le même nombre de trous que l'objet de départ mais qui peut être branché (Figure 63).

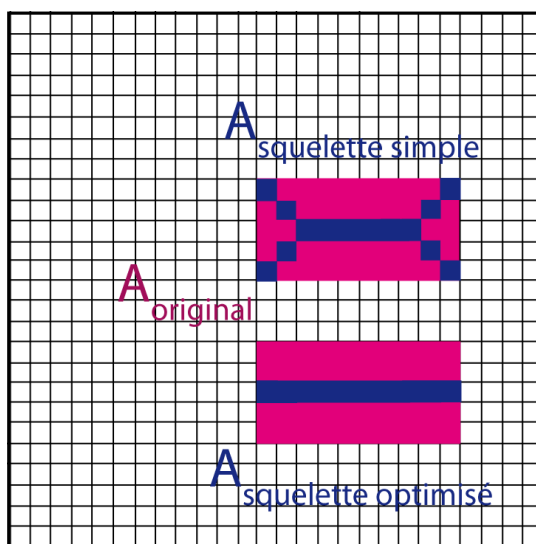


Figure 63 : Squelette et amincissement

L'obtention du squelette de l'objet A_{original} peut être réalisée par différentes méthodes. Dans la version la plus simple on utilise l'opération de tout ou rien qui conduit à au squelette $A_{\text{squelette simple}}$. Comme on le voit ce type de méthode ne respecte pas la propriété de médianité aux extrémités de l'objet. Tout se passe comme si on avait créé des bras parasites. Dans notre cas ceci peut conduire à des erreurs dans la détermination du squelette des bras ADN des nucléosomes et par conséquent dans la détermination de leur longueur. Nous utilisons donc un algorithme plus robuste d'amincissement nous permettant comme le montre le squelette $A_{\text{squelette optimisé}}$ de conserver parfaitement la forme de l'objet.

Ce type d'algorithme n'est pas assez robuste pour le traitement de données biologiques pour lesquelles le bruit de mesure est important. On peut citer deux inconvénients majeurs : l'algorithme a une grande sensibilité au bruit sur la forme du contour (chaque protubérance du contour donne lieu à branchement parasite) et il ne nous assure pas dans tous les cas que le squelette trouvé représente la ligne médiane de l'objet. C'est pourquoi nous avons, dans la suite de ce travail, utilisé un autre algorithme développé par (Lam *et coll.* 1992) et basé sur le même procédé que l'opérateur d'amincissement. Sans rentrer dans le détail, cet algorithme favorise certaines directions ce qui permet de réduire le nombre de branchements parasites. Il existe une large littérature sur l'obtention de squelette en 2D ou 3D, des méthodes plus complexes comme l'utilisation d'un champ de distance ou les méthodes géométriques (pour revue : (Cornea *et coll.* 2007)) permettraient d'obtenir une résolution sub-pixel et d'éviter totalement les bras parasites. Néanmoins comme nous le verrons par la suite l'analyse d'image utilisant l'algorithme d'amincissement optimisé suffit pour obtenir une erreur bien plus faible que les autres sources de bruit lié à la physique du nucléosome.

2.2.1.8 Segmentation et morphologie

Considérons une image I en nuances de gris (ou une surface du point morphologique) dans laquelle nous souhaitons séparer des objets du fond. Si l'on suppose que les objets sont plus hauts que le bruit, la technique la plus simple est de rechercher quels sont les pixels correspondants. Pour ce faire, on fixe un seuil et on cherche les pixels dont la valeur est supérieure. Ce type de seuillage est peu efficace, il nécessite un bruit faible et a tendance à sous-estimer la taille des objets. On utilise donc généralement un seuillage dynamique. Nous présentons ici le seuillage à hystérésis (Figure 64) car il utilise des outils morphologiques présentés précédemment.

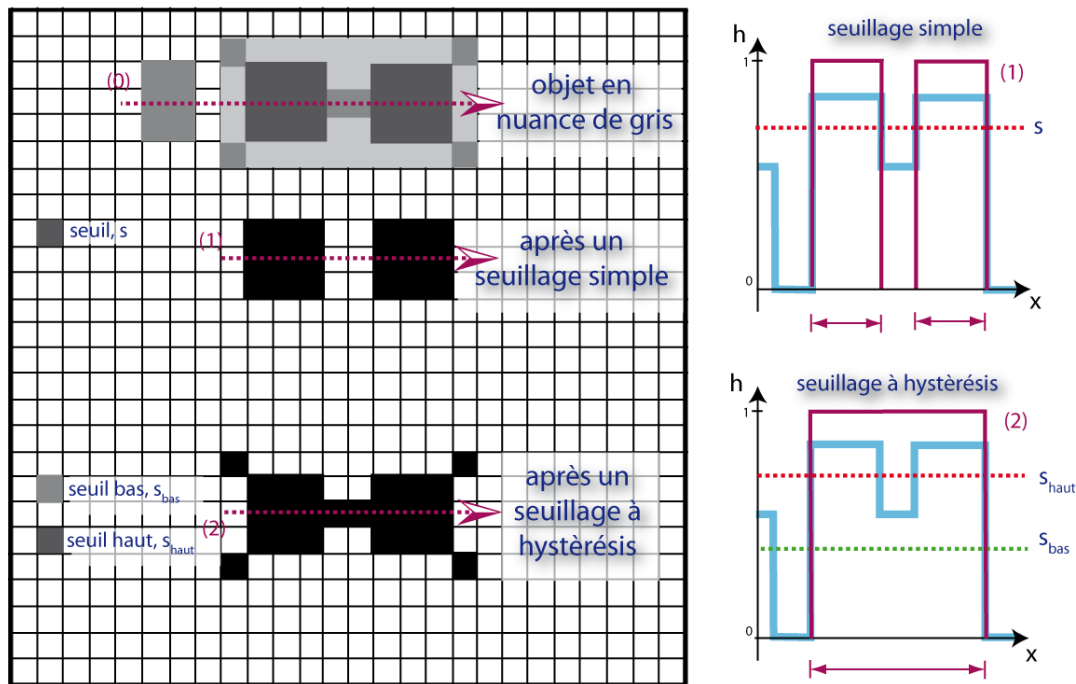


Figure 64 : Seuillage simple et seuillage à hystérésis

(1) Lors d'un seuillage simple on ne conserve que les parties de l'objet plus hautes que le seuil s sans prendre en compte la connexion de ces zones entre elles. Ceci conduit en général à sous-estimer la taille de l'objet et à séparer des parties connectées. (2) A l'opposé un seuillage dynamique comme le seuillage à hystérésis comporte deux seuils s_{haut} et s_{bas} qui permettent une tolérance plus grande dans les pixels à conserver en fonction de leur environnement local.

Le seuillage à hystérésis est un seuillage à deux niveaux s_{haut} et s_{bas} . Les pixels ayant une valeur plus grande que s_{haut} sont conservés et appelés des pixels 'forts' ; les pixels dont la valeur est plus basse que s_{bas} sont rejetés et appelés des pixels 'faibles'. Les autres pixels sont appelés pixels 'candidats'.

Le but de ce filtre est de déterminer quels sont groupes de pixels 'candidats' connectés entre eux qui sont connectés à des pixels 'forts'. Ce type de seuillage fait l'hypothèse que les objets que nous souhaitons séparer du fond sont plus hauts que s_{haut} mais ont des parties plus basses qui s'étendent jusqu'à s_{bas} .

Ce type de seuillage dynamique présente plusieurs avantages par rapport à un filtre simple : on décrit mieux les objets car le seuil bas peut être de l'ordre du bruit et on est beaucoup plus sélectif car le seuil haut peut être beaucoup plus haut que le bruit.

Il existe bien d'autres techniques de segmentation pour des objets plus bas que le bruit (Pham *et coll.* 2000), elles nécessitent néanmoins de connaître de manière plus précise la forme des objets recherchés et correspondent dans notre cas à un gain de précision très réduit.

2.2.1.9 L'AFM, une dilatation en nuance de gris

Comme nous l'avons vu lors de la présentation de l'AFM, un certain nombre de régions de la surface de l'échantillon sont inaccessibles à la pointe de l'AFM. En fait, on peut aussi voir l'opération de balayage AFM comme une dilatation en nuance de gris. Tout se passe comme si l'image AFM était la dilatée de l'image initiale par l'élément structurant 3D qu'est la pointe AFM (Figure 49). Il est donc possible de simuler l'effet de cette dilatation sur une surface connue. Ceci nous permettra par exemple d'estimer le rayon de courbure finale de notre pointe.

On peut alors se demander s'il est possible de résoudre le problème inverse qui consiste à calculer la surface initiale à partir de l'image dilatée. Si l'on considère la pointe AFM comme un objet structurant 3D supposé connu peut-on résoudre le problème inverse par l'érosion de l'image AFM ? Malheureusement, la dilatation est un phénomène non linéaire et non injectif (deux objets différents pourront avoir des dilatés semblables). Donc l'érosion en nuance de gris n'est pas la transformation inverse de la dilatation en nuance de gris.

Néanmoins, il existe des algorithmes permettant d'estimer la forme de la pointe et quelles sont les zones de l'image que la pointe ne peut atteindre (Villarrubia 1997; Horcas *et coll.* 2007).

2.2.2 Pré-traitements

2.2.2.1 Aplatissements

Les images AFM sont sujettes, comme présenté dans la section 2.1, à un certain nombre d'artefacts récurrents dont le fluage thermique de la céramique piezo-électrique. L'impact de cette déformation, qui est inévitable sur les images AFM, est une dérive en Z de l'image: tout se passe comme si la hauteur Z était modulée dans la direction lente du balayage (la verticale sur la Figure 65).

Pour s'en affranchir, on utilise des algorithmes d'aplatissements. La version la plus simple de cette opération est de soustraire à chaque ligne de l'image (i.e. l'axe rapide) la moyenne ou la médiane du profil selon cette direction. Ce calcul est simple et très rapide mais nécessite que l'image comporte peu d'objets et que la hauteur des objets déposés soit faible pour que la moyenne du fond soit bien définie.

Typiquement si nos objets sont N demi-ellipsoïdes de révolution de demi grand axe a et de demi petit axe b , la section S de ces demi-ellipsoïdes parallèle à l'axe rapide et passant par leur sommet sont des demi-ellipses 'posées' sur une ligne de base de longueur $L-N \cdot R$. La moyenne de ce signal est donc :

$$\mu = \frac{1}{L} \int_0^L S(x) dx = \frac{1}{L} \left(0 + N \cdot \pi \cdot a \cdot b / 2 \right) = \frac{N \cdot \pi \cdot a \cdot b}{2L}$$

Dans notre cas $L = 1 \mu\text{m}$, $a \sim 10\text{nm}$, $b = 5\text{nm}$, $N \sim 5$ par ligne, d'où $\mu \sim 0,5 \text{ nm}$. L'ADN faisant pour mémoire 2 nm de diamètre, on voit que l'erreur sur la détermination de la moyenne par cette méthode n'est pas du tout négligeable par rapport à la hauteur de nos objets

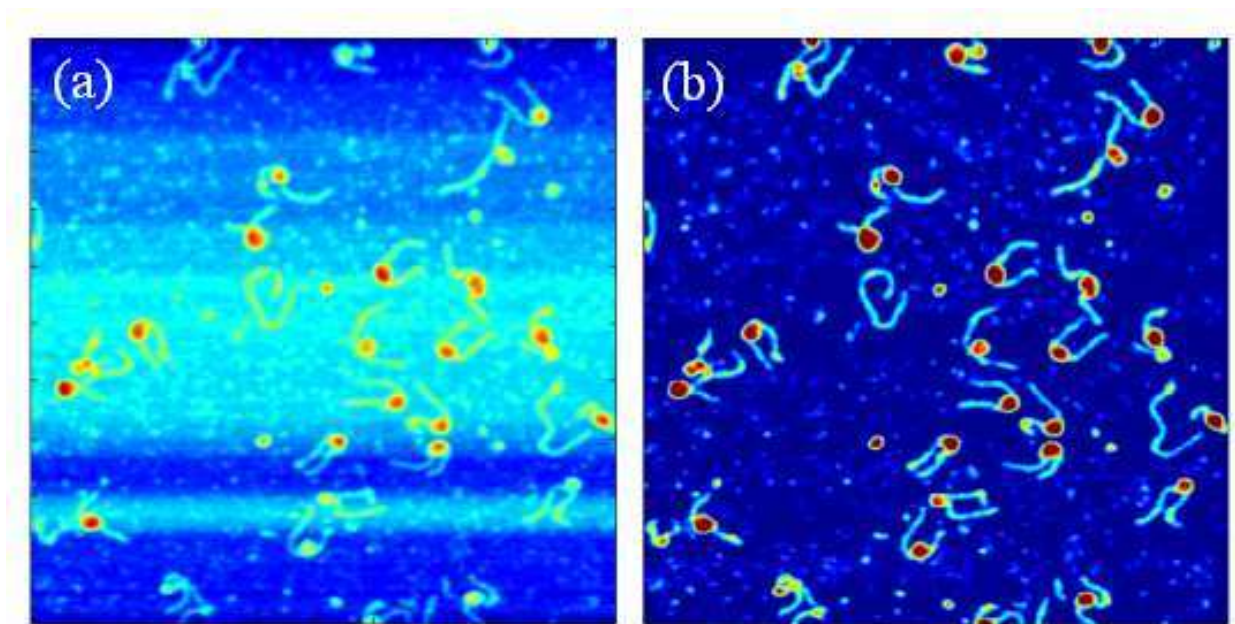


Figure 65 : Aplatissement des images AFM

(a) image AFM brute de mono-nucléosomes positionnés. Images de 500 x 500 nm. Echelle Z : de 0 (bleu foncé) à 1.5nm (rouge). (b) La même image AFM après aplatissement sous condition de hauteur. La direction lente du balayage est la direction verticale.

Du fait de la faible rugosité de la surface ($RMS \sim 1,4 \text{ \AA}$) et du nombre peu important d'objets par ligne (de 1 à 5 selon les cas) il est en fait possible de retirer les objets du calcul de la moyenne (Figure 65). Cet aplatissement sous conditions de hauteur permet alors d'éviter le biais sur la moyenne mais il faut alors déterminer un seuil de taille au-delà duquel rejeter les objets. Ceci nécessite d'avoir une surface très propre et des objets de taille reproductible. Heureusement, dans notre cas la structure du nucléosome et celle de l'ADN sont extrêmement reproductibles d'une expérience à l'autre.

2.2.2.2 Sur-échantillonnage

Ensuite nous sur-échantillonnons deux fois les images AFM par une interpolation 2D utilisant des polynômes cubiques. Cette opération n'augmente pas la quantité d'information présente dans l'image mais conduit à une image comportant plus de pixels ce qui permettra d'utiliser les outils morphologiques de manière plus robuste et plus lisse que l'image initiale ce qui évite en particulier les effets de pointes lors des segmentations. Elle revient à utiliser un filtre passe-bas de fréquence $f_0/2$ où $f_0 = 1/N$ et $N = 512$ est la largeur en pixels de l'image carrée initiale.

2.2.3 Analyse des mono-nucléosomes

Pour chaque image, après avoir réalisé les pré-traitements précédents nous avons mesuré les paramètres d'intérêts en utilisant le protocole suivant (Figure 66):

1- Sélection des objets d'intérêts

- 1 – Seuillage de l'image initiale *img* au-dessus du fond \rightarrow *img_th* (Figure 66b)
- 2 – Fermeture de l'image seuillée *img_th* et enlèvements des épines
- 3 – Sélection des objets binaires de *img_th* d'une aire supérieure à a_{min} et inférieure a_{sup} (Figure 66c)

4 – Seuillage de l'image au-dessus de l'ADN \rightarrow *img_nuc* (Figure 66d)

5 – Fermeture de l'image seuillée *img_nuc* et enlèvements des épines

6 – Dilatation géodésique des objets de *img_nuc* dans *img_th* (seuillage par hystérésis) \rightarrow *img_with_nuc*

7 – Vérification du nombre de NCPs par mono-nucléosome (Figure 66e).

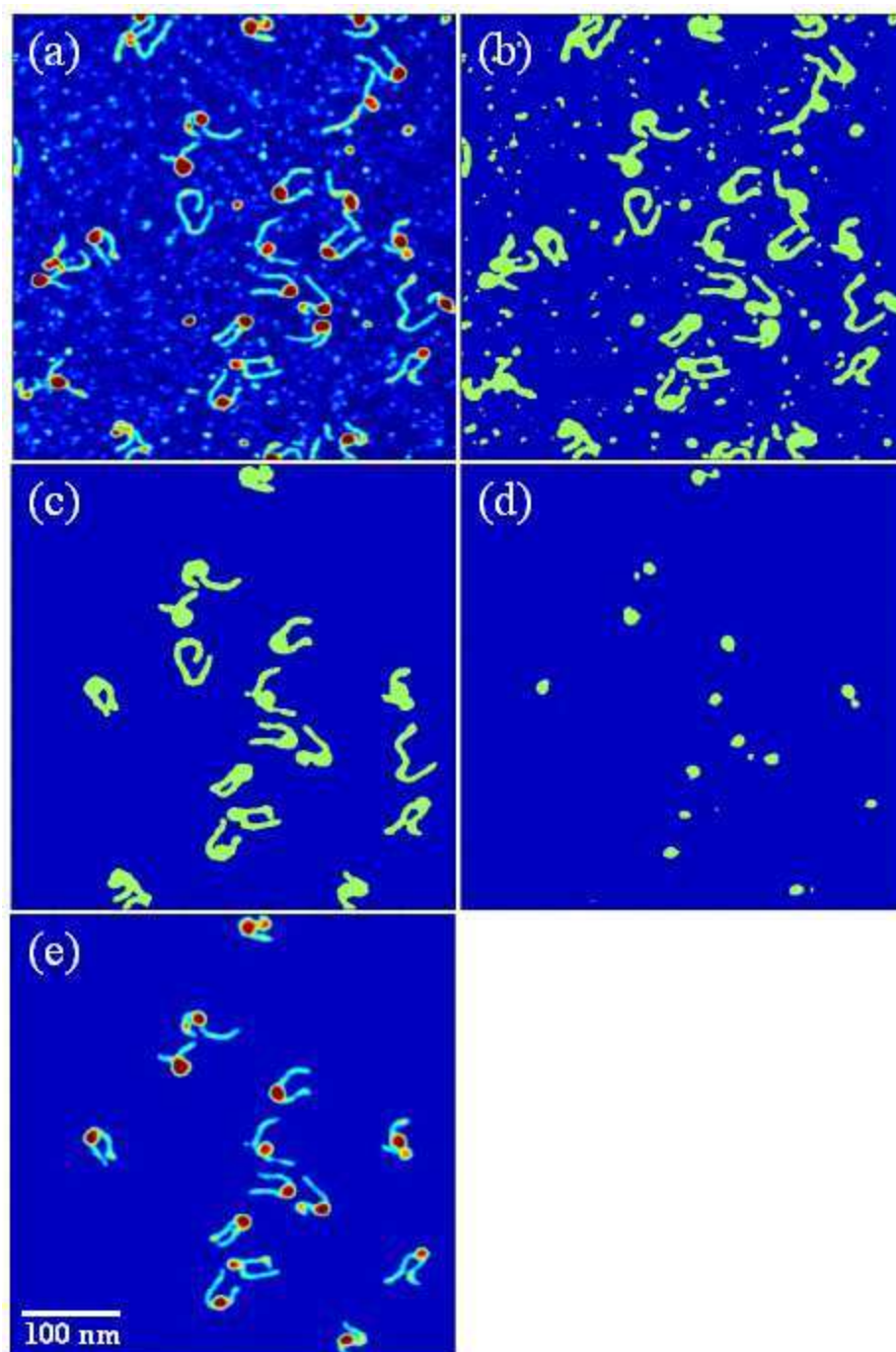


Figure 66 : Etapes de la sélection des objets d'intérêts

(a) image topographique après pré-traitements (*img*) (b) image binaire après seuillage de hauteur au-dessus du fond et avant seuillage d'aire (*img_th*) (c) image binaire après seuillage d'aire (*img_th*) (d) image binaire après seuillage de hauteur au-dessus de l'ADN (*img_nuc*) (e) Image topographique des nucleosomes candidats après le seuillage par hystérésis (*img_with_nucleosome* \times *img*)

II- Extraction des paramètres

- 8 – Calcul du centroïde des NCP \rightarrow *img_centroid*
- 9 – Calcul d'une carte de distances géodésiques à partir des centroïdes et à l'intérieur de *img_th* (Figure 68b)
- 10 – Squelettisation de *img_th* (Figure 68d)
- 11 – Détermination des extrémités des bras (Figure 68c)
- 12 – Calcul de la longueur des bras (Figure 68e)
- 13 – Elimination des bras parasites par dilatation géodésique
- 14 – Détermination de l'aire et du volume des NCP et des nucléosomes

Nous allons maintenant développer certains de ces points et leur intérêt pour notre analyse.

2.2.3.1 Sélection des objets d'intérêts

La première série d'étapes (de 1 à 7) présentées ici nous conduit de l'image brute à la localisation sur ces images des mono-nucléosomes prêts à être analysés (Figure 66). Il convient donc de segmenter l'image c.-à-d. créer différentes classes de pixels. A partir de l'image AFM nous allons construire des masques (c.-à-d. des images binaires) correspondants à différentes propriétés locales (par exemple le masque des mono-nucléosomes, le masque des NCPs, ...). L'intérêt de ce codage est que nous pouvons facilement combiner ces propriétés en cherchant l'intersection ou l'union des masques. Certains sont créés par un seuillage simple (comme *img_th* et *img_nuc*), d'autres par un seuillage à deux niveaux ou seuillage à hystérésis, d'autres encore par l'érosion ultime d'un autre masque (*img_centroid*). Dans tous les cas, l'enjeu principal de cette segmentation est de construire des masques le plus précis possible à partir de l'image issue de l'AFM. Un autre but de cette analyse est de travailler autant que faire se peut sur une image entière en traitant tous les nucléosomes en même temps pour accélérer le temps de calcul.

Comme expliqué plus haut, la segmentation commence sur une image lissée puisque sur-échantillonnée deux fois. Ceci nous permet d'éviter certaines erreurs de calcul dues à un faible nombre de pixels dans l'objet binaire considéré (par exemple des mesures d'aires), de réduire le nombre d'épines de l'image qui seront à l'origine d'autant de faux bras lors de la squelettisation (Figure 67 et cf. section 2.2.1.7), mais ralentir le temps de calcul d'un facteur 2 environ.

0	0	0	0
0	0	1	0
0	1	0	0
1	1	0	0

Figure 67 : Exemple de pixel formant une épine

On appelle épine un pixel (en rouge) connecté à un objet binaire (en gras et en noir) uniquement par un seul pixel en diagonale de celui-ci. Autrement dit c'est un pixel connecté en connexité 8 mais isolé en connexité 4.

Les premières étapes de la segmentation sont destinées à produire deux masques (*img_th* et *img_nuc*) qui correspondent respectivement aux pixels plus haut que le fond et aux pixels plus haut que l'ADN. Ils sont produits par seuillage simple puis fermeture. La détermination des seuils est réalisée, d'une part en analysant l'histogramme des hauteurs pour une image AFM de fond seul (AP-Mica, voir section 2.3.3) et d'autre part en analysant une image AFM de molécules d'ADN de la même taille, déposées sur la même surface. En outre, pour éviter de sélectionner des di-

nucléosomes (correspondant à deux mono-nucléosomes liés sur la surface) ou des histones libres nous ne sélectionnons sur *img_th* que les objets binaires ayant une aire comprise dans une fourchette prédéterminée. Cette fourchette est, bien entendu, dépendante de la longueur du fragment d'ADN utilisée. Nous la déterminons en observant quels sont les nucleosomes rejetés lors de l'analyse et en vérifiant après coup que la distribution d'aire des nucleosomes analysés n'est pas coupée. De même, pour éviter de sélectionner des tétrasomes dans *img_nuc* nous choisissons en fait un seuil supérieur à la hauteur du tétrasome et nous vérifions sur la distribution de longueur complexée finale.

A partir de ces deux masques nous créons ensuite le masque des objets plus hauts que la SAM et ayant une partie plus haute que l'ADN ce qui sera en fait le masque des nucléosomes à analyser (*img_with_nuc*). Pour ce faire nous réalisons un seuillage à hystérésis à partir d'une dilatation géodésique (cf. section 2.2.1.6) de *img_nuc* dans *img_th*. Nous terminons cette segmentation en vérifiant que les mono-nucléosomes sélectionnés ne comporte qu'un seul NCP c'est à dire que chaque objet binaire de *img_with_nuc* a une intersection avec seul objet binaire de *img_nuc*.

2.2.3.2 Extraction des paramètres et résolution de la méthode

Dans une première étape nous réalisons une érosion du masque des NCP (*img_nuc*) jusqu'à ce que chaque NCP ne corresponde plus qu'à un pixel. L'objet structurant utilisé possédant une symétrie centrale, on peut montrer (Gonzales *et coll.* 1987) que ce pixel est le barycentre de l'objet binaire initial. Il représente donc le centroïde du NCP de départ. Du fait du nombre de pixels important dans chaque objet binaire représentant le NCP et du fait du sur-échantillonnage lors du pré-traitement la précision sur son positionnement à l'intérieur du masque est de 1 pixel soit ~ 3 pb. Nous verrons pour l'étude des oligosomes que l'on peut obtenir un positionnement sub-pixel en calculant la moyenne des points présents dans le masque. Néanmoins étant données les étapes qui suivent, ce type d'algorithme n'était pas utile dans ce cas-ci.

Nous calculons ensuite une carte des distances à ce centroïde en restant contraint au masque *img_with_nuc* (Figure 68b). Comme expliqué plus haut une dilatation géodésique est un bon outil pour cette étape. Ceci nous permet également de travailler en parallèle sur tous les nucléosomes.

Nous réalisons alors une squelettisation de *img_with_nuc* pour les pixels ayant une distance géodésique au centroïde supérieure à 8 nm. Ceci revient à exclure les NCP (Figure 68c) et à chercher uniquement le squelette c'est à dire la courbe médiane des bras libres des nucléosomes (Figure 68d).

Nous cherchons alors tous les bouts de ces squelettes (2 par mono-nucléosomes). Pour ce faire nous recherchons leurs épines.

Nous déterminons ensuite pour chacun leur distance géodésique au centroïde. Pour éliminer les faux bras produits lors de la squelettisation, nous réalisons une dilatation géodésique en nuance de gris à partir des bouts auxquels nous avons attribué leur distance au centroïde. Ceci revient à ne garder pour chaque bras que le bout ayant la distance géodésique au centre la plus grande. Cette méthode est efficace car on a, dans les étapes précédentes, tout fait pour réduire le nombre d'épines sur le contour et donc le nombre de bras aberrants après squelettisation.

Enfin nous classons pour chaque nucléosome les deux distances obtenues, L_+ et L_- qui sont respectivement la longueur du bras le plus long et la longueur du bras le plus court du mono-nucléosome. Comme il nous est impossible de savoir quelle est l'orientation sous-jacente de la séquence c'est à dire l'orientation 3'-5' nous ne pouvons pas déterminer quel est le bras 3' et quel est le bras 5'. Formellement ceci revient à lier ces deux distances qui ne sont alors plus comme nous le verrons des paramètres indépendants.

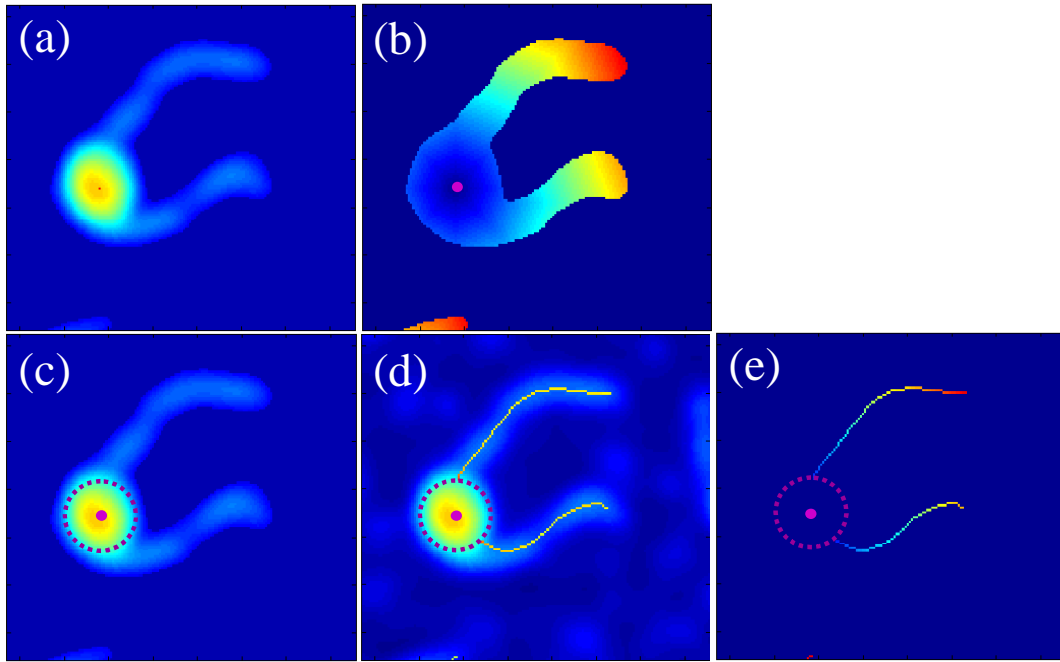


Figure 68 : Etapes de l'extraction des paramètres d'intérêts

(a) zoom de *img_with_nuc*. (b) carte de distance géodésique au centroïde du NCP (en mauve). (c) exclusion du NCP (en pointillé mauve). (d) squelettisation des bras (en jaune). (e) mesure de la longueur des bras en appliquant la carte de distance aux squelettes des bras.

Puis nous calculons, L_c , la longueur d'ADN complexée par le nucléosome et ΔL la position de la dyade par rapport au milieu de la séquence ADN par :

$$L_c = L_{tot} - L_+ - L_-$$

et

$$\Delta L = \frac{L_+ - L_-}{2}$$

La perte d'information sur l'orientation de la séquence impose dans ce cas que ΔL soit une valeur positive.

Essayons maintenant de déterminer en ordre de grandeur quelle est la résolution de cet algorithme. La position du centroïde est déterminée à 1 nm près de même que celle du bout des bras. Si l'on considère que ces variables sont non corrélées. La longueur de chaque bras est donc déterminée à ~ 1.44 pixel. Ce qui revient à dire que la résolution minimum sur L_c et ΔL est de ~ 3 pixels soit 9 pb. Néanmoins nous allons tirer avantage du fait que nous travaillons sur des molécules uniques. En effet, cette résolution est celle obtenue pour un événement unique alors que la résolution finale est celle sur la détermination des maxima de ces distributions. En fait si nous visualisons exactement la même structure (c.-à-d. dans notre cas un nucléosome dans la même configuration) les distributions de L_c et ΔL seront des gaussiennes (théorème de la limite centrale) centrées sur $\langle L_c \rangle$ et $\langle \Delta L \rangle$ et de largeur à mi-hauteur 9 pb. Nous pouvons vérifier cette hypothèse en imageant des ADN courts et en utilisant le même type de script. La détermination du maximum de probabilité de ces distributions peut être réalisée avec une précision très bonne qui ne dépend en fait que du nombre N de configurations mesurées en utilisant cet algorithme ($9 \text{ pb} / \sqrt{N}$). Dans la pratique, les maxima de la distribution (locaux ou non) seront déterminés avec une résolution sub-manométrique ($N \gg 100$) et le facteur limitant sera l'ouverture et la fermeture des bras du nucléosome sous l'influence du mouvement brownien comme nous le verrons dans la partie résultat à l'aide de la simulation d'images AFM.

2.2.4 Analyse des mono-nucléosomes marqués streptavidine

Pour chaque image après avoir réalisé les pré-traitements nous avons mesuré les paramètres d'intérêts en utilisant le protocole suivant :

I - Sélection des objets d'intérêts

- 1 – Seuillage de l'image initiale *img* au-dessus de la SAM \rightarrow *img_th*
- 2 – Fermeture de l'image seuillée *img_th* et enlèvements des épines
- 3 – Sélection des objets binaires de *img_th* d'une aire supérieure à a_{min} et inférieur a_{sup}
- 4 – Seuillage de l'image au-dessus de l'ADN \rightarrow *img_nuc*
- 5 – Fermeture de l'image seuillée *img_nuc* et enlèvements des épines
- 6 – Dilatation géodésique des objets de *img_nuc* dans *img_th* (seuillage par hystérésis) \rightarrow *img_with_nuc*
- 7 – Recherche des objets de *img_with_nuc* avec deux objets dans *img_nuc* \rightarrow *img_with_nuc_di* et *img_nuc_di*

II - Extraction des paramètres

- 1 – Labellisation des objets de *img_nuc_di* \rightarrow *img_octstrept_label* (valeur 1 ou 2)
- 2 – Calcul du centroïde des objets de *img_nuc_di* \rightarrow *img_centroid_di*
- 3 – Calcul de cartes de distance géodésique à partir des centroïdes de la streptavidine puis du NCP et à l'intérieur de *img_nuc_di* \rightarrow *img_d_1* et *img_d_2* (Figure 69)
- 4 – Calcul de cartes de distance géodésique maximum et minimum à partir des centroïdes de la streptavidine et du NCP et à l'intérieur de *img_nuc_di* (Figure 69)
- 4 – Calcul de la longueur du bras NCP - streptavidine
- 5 – Détermination du bras sans streptavidine
- 6 – Squelettisation du bras libre et mesure de sa longueur
- 7 – Calcul des aires des objets de *img_nuc_di*

Nous allons, dans les sections suivantes, développer certains de ces points et leur intérêt pour notre analyse.

2.2.4.1 Sélection des objets d'intérêts

La première partie de l'analyse jusqu'au point 7 est identique à l'analyse des mono-nucléosomes non marqués à la différence que l'on sélectionne au final uniquement les nucléosomes comportant deux parties distinctes dont la hauteur dépasse celle de l'ADN (le NCP et la streptavidine). Les seuils d'aire utilisés sont également ajustés en conséquence.

2.2.4.2 Extraction des paramètres et résolution de la méthode

Dans une première partie nous labellisons les objets dont la hauteur excède celle de l'ADN (masque *img_nuc_di*) à l'intérieur du masque *img_with_nuc_di*. La labellisation revient à numéroter de 1 à N les N objets binaires d'une image. Dans notre cas nous choisissons, pour chaque mono-nucléosome marqué, de nommer arbitrairement 1 la streptavidine ou le NCP puis de nommer 2 l'autre objet.

L'intérêt du script est que nous mesurons indépendamment de la longueur des bras libres et des bras liés à la streptavidine sans avoir à déterminer quel objet est le NCP et quel objet est la streptavidine. En effet, même si la streptavidine et le nucléosome ont des poids moléculaires et donc des volumes différents (45 kDa et 200 kDa respectivement), il peut être parfois difficile de les

différentier sur leur taille. Nous avons donc choisi d'utiliser la topologie particulière du système que nous utilisons : le NCP est entouré de deux bras alors que la streptavidine est, par construction, à l'extrémité d'un bras.

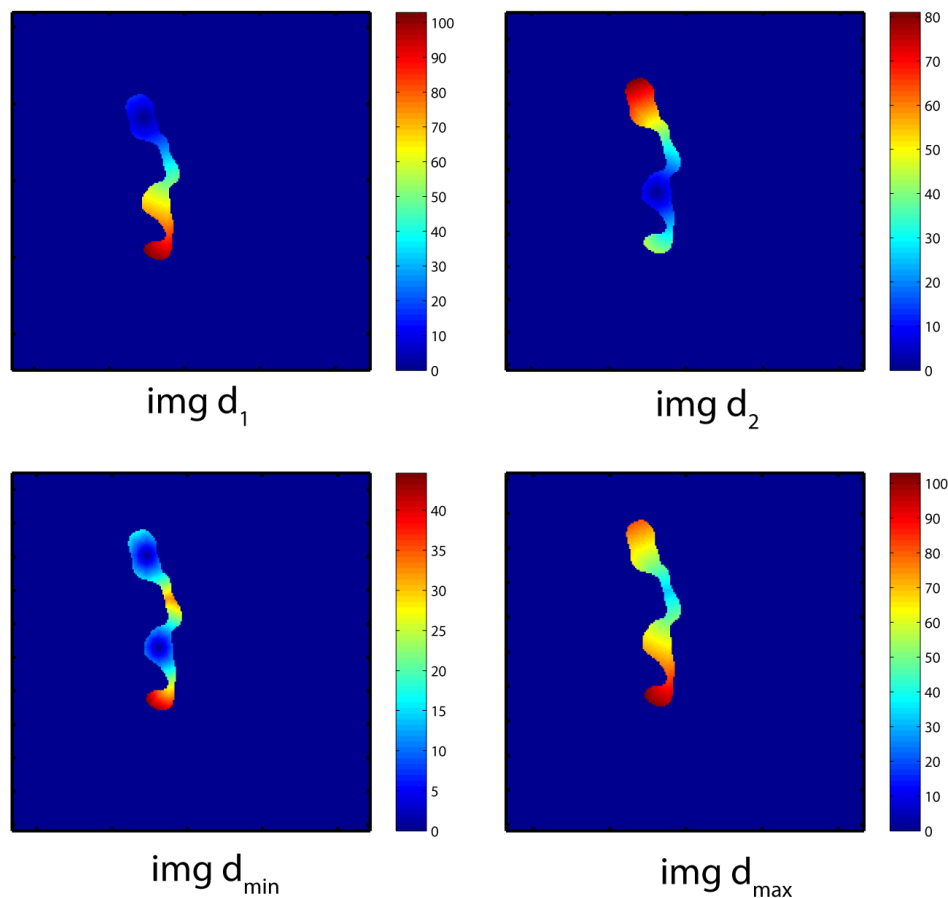


Figure 69 : Analyse de mono-nucléosomes marqués par une streptavidine.

On calcule deux cartes de distances : une en partant de la streptavidine et une autre en partant du NCP (*img_d_1* et *img_d_2*). Puis on construit deux cartes : le minimum de *img_d_1* et *img_d_2* (*img_d_min*) et le maximum (*img_d_max*).

Ainsi, après avoir extrait la position des centroïdes des streptavidines et des NCPs (*img_nuc_centroid_di*), nous calculons comme précédemment une carte de distance à partir de chacun des centroïdes à l'intérieur du masque *img_with_nuc_di*. En fait, on réalise deux cartes de distances : une en partant de la streptavidine et une autre en partant du NCP. La longueur du bras streptavidine est alors indistinctement la distance géodésique du NCP vers la streptavidine ou l'inverse. Il n'est donc pas nécessaire de squelettiser le bras lié à la streptavidine pour avoir la mesure de sa longueur.

Pour déterminer l'ensemble des pixels qui font partie du bras libre, nous construisons deux cartes : la première est le maximum (*img_d_max*) de *img_d_1* et *img_d_2*, la deuxième est le minimum (*img_d_min*) (Figure 69). On peut montrer que cette représentation permet de segmenter simplement les bras marqués et non marqués. Tous les pixels du mono-nucléosome marqué dont la distance *img_d_max* est supérieure à $(l_{strepta} + r_{NCP})$ sont des pixels appartenant au bras libre.

Nous squelettisons alors le bras libre comme précédemment et nous déterminons son extrémité. La longueur du bras libre est alors la valeur dans *img_d_min* de la position du bout.

Pour finir, nous déterminons les aires et les volumes des NCPs et des streptavidines par intégration.

2.2.5 Analyse des chromatines

Pour chaque image, après avoir réalisé les pré-traitements nous avons mesuré les paramètres d'intérêts en utilisant le protocole suivant :

I - Sélection des objets d'intérêts

- 1 – Seuillage de l'image initiale *img* au-dessus de la SAM \rightarrow *img_th*
- 2 – Fermeture de l'image seuillée *img_th* et enlèvements des épines
- 3 – Sélection des objets binaires de *img_th* d'une aire supérieure à a_{min} et inférieure a_{sup}
- 4 – Calcul de la courbure locale à l'aide du Laplacien 2D de l'image seuillée *img_th* et seuillage en courbure et en aire \rightarrow *img_nuc*
- 5 – Fermeture de l'image seuillée *img_nuc* et enlèvements des épines

II - Extraction des paramètres

- 1 – Calcul du centroïde des objets de *img_nuc* en calculant la moyenne des positions
- 2 – Mesure de la distance euclidienne entre un NCP et les autres NCP d'une pelote
- 3 – Calcul de la distance moyenne au premier voisin et de la distance moyenne aux autres nucléosomes pour chaque pelote
- 4 – Calcul du grand axe et du petit axe de chaque pelote (Figure 70)
- 5 – Calcul de l'aire et du volume de chaque pelote (Figure 70)

Nous allons développer les points plus particulièrement spécifiques de cette analyse.

2.2.5.1 Sélection des objets d'intérêts

La première partie de l'analyse jusqu'au point 3 est identique à l'analyse des monos non marqués à la différence que les seuils d'aire utilisés sont modifiés pour s'adapter à la taille des pelotes reconstituées sur des fragments de longueurs différentes ($N = 5, 9, 15$ ou 32 nucléosomes).

Du fait de la forte compaction de la fibre de chromatine il devient impossible dans ce cas ci de suivre le trajet de la molécule d'ADN hors des nucléosomes. Dans certains cas les nucléosomes sont tellement proches qu'il est de même impossible de séparer les NCPs par seuillage dynamique ou non. La solution retenue ici pour repérer les NCPs est donc de calculer le Laplacien de l'image initiale ce qui revient à calculer la courbure locale. La forme des NCPs étant très reproductible, il est alors facile de déterminer une fenêtre de courbures correspondantes aux NCPs. Pour éviter de sélectionner des régions correspondant à des zones d'ADN compactes et courbés nous ajoutons à ce critère de courbure un critère d'aire minimum. Ceci nous permet comme précédemment de créer un masque des NCPs (*img_nuc*).

2.2.5.2 Extraction des paramètres

La distance euclidienne entre deux NCPs dans la fibre de chromatine est souvent très faible. En effet, dans certaines conditions ioniques les nucléosomes sont même au contact les uns des autres. Ceci veut dire qu'il y a très peu de pixels entre 2 NCPs. De plus, nous ne pouvons plus suivre le chemin de l'ADN. C'est pourquoi dans cette analyse nous avons déterminé la position des centres des NCP non par érosion ultime puis distance géodésique mais en calculant la moyenne arithmétique des positions du NCP et en mesurant des distances euclidiennes entre ces NCPs.

En pratique pour chaque NCP nous calculons les coordonnées spatiales du barycentre non plus au pixel près mais en faisant la moyenne arithmétique des coordonnées x et y des pixels de ce NCP. Cette méthode plus précise nous permet d'obtenir une précision sub-nanométrique de la position en X-Y des centroïdes des NCP.

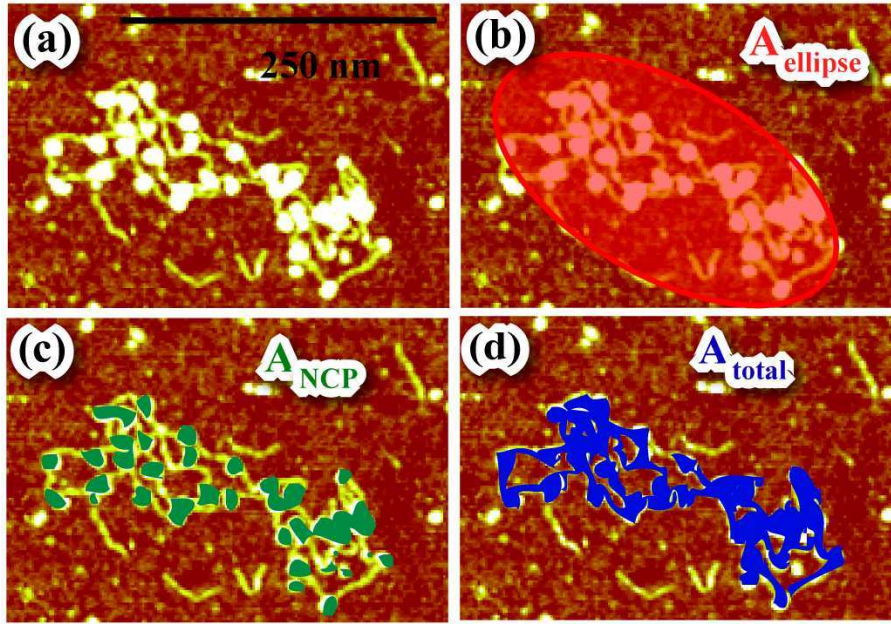


Figure 70 : Quelques éléments mesurés sur les chromatines

Pour chaque fibre de chromatine visualisée par AFM (a), on extrait différents paramètres tels que (b) l'aire de l'ellipse qui circonscrit 95% des nucleosomes, (b) l'aire des NCPs, ou encore (d) l'aire totale de la fibre. On détermine également la position des centroïdes de chaque NCP.

Enfin, on détermine certains paramètres qui, comme nous le verrons, permettent de rendre compte de l'organisation locale ou globale de chromatine. Voici quelques exemples de paramètres structuraux que nous pouvons déterminer notre analyse pour chaque pelote (Figure 70) :

- On calcule les distances euclidiennes $\|nuc_i nuc_j\|$ entre les centroïdes des NCPs i et j , pour i et j allant de 1 à N , où N est le nombre de nucléosomes dans la pelote.
- Pour déterminer l'aire de l'ellipse qui circonscrit 95% des nucleosomes, on extrait les deux composantes principales des séries 2D définies par les coordonnées des centroïdes des NCPs. Le grand et le petit axe de l'ellipse sont définis par les deux directions principales ainsi déterminées et la longueur de chaque demi-grand axe a et demi-petit axe b correspond à l'écart type de la distribution 2D des positions selon les deux axes principaux (Figure 70b).
- On peut calculer une compacité à deux dimensions C_{2D} ($1 - C_{2D}$ correspond à la proportion de 'trous' dans la surface occupée par la pelote). C_{2D} est défini comme le rapport entre l'aire totale projetée de la fibre (A_{total} égale au nombre de pixels au-dessus du seuil de bruit, voir Figure 70d) et l'aire de l'ellipse que l'on vient de définir ($A_{Ellipse} = \pi * a * b$).
- Pour chaque NCP, on détermine la distance à son premier voisin, puis pour la pelote, la distance moyenne d'un nucléosome de la pelote à son plus proche voisin par :

$$d_{premier\ voisin} = \langle \min_j \|nuc_i nuc_j\| \rangle_i .$$

- On estime la distance caractéristique entre nucléosomes de la pelote à partir de l'aire totale de la pelote A_{total} , en supposant que chaque nucléosome occupe le même pourcentage de l'aire totale :

$$d_{inter\ nuc} = 2 \sqrt{\frac{A_{total}}{\pi N}} .$$

- On peut calculer le rayon de giration de la pelote à partir des distances entre centroides, comme :

$$R_g = \sqrt{\frac{1}{N^2} \sum_{i \neq j} \|nuc_i nuc_j\|^2}$$

- et le rayon hydrodynamique comme :

$$R_{hydro} = \frac{1}{\frac{1}{N(N-1)} \sum_{i \neq j} \frac{1}{\|nuc_i nuc_j\|}}$$

2.2.6 Boite glissante

Pour représenter nos distributions à 1 ou 2 dimensions nous avons choisi d'utiliser une méthode de boite glissante.

Pour réaliser un histogramme habituel on découpe l'intervalle de mesure en N segments consécutifs et on compte le nombre d'évènements mesurés qui correspondent à chacun de ces segments (Figure 71). Cette méthode permet quand N tend vers l'infini d'obtenir une approximation de la distribution expérimentale recherchée (méthode dite des rectangles). Néanmoins elle est très sensible à la position des évènements dans l'intervalle. S'il existe une incertitude de mesure dans la position de l'évènement, un évènement proche du centre de l'intervalle sera toujours bien compté dans cet intervalle alors qu'un évènement proche de la limite entre deux segments sera lui pris en compte alternativement dans l'un ou l'autre des intervalles (algorithme non-linéaire). Ce bruit de comptage est négligeable pour de grands nombres d'évènements mais devient gênant pour des statistiques moins importantes comme lors des expériences de molécules uniques.

Nous avons donc choisi d'utiliser une autre méthode pour approcher les distributions de nos différents paramètres. Elle consiste à utiliser une boite glissante. A 1D, cela revient à affecter à chaque évènement une aire d'influence. Chaque évènement influence la distribution expérimentale de manière linéaire sur un intervalle donné ou boite autour de lui. En sommant les contributions de chaque évènement on obtient donc une approximation de la distribution expérimentale. Plus exactement, la courbe obtenue est la convolution de la distribution expérimentale par une fonction porte représentant l'aire d'influence d'un évènement. Si l'on utilise une taille de boite faible par rapport à la largeur de la distribution la courbe obtenue par cette méthode est donc très proche de la distribution cherchée (Figure 71).

Parce que chaque évènement influence la distribution de la même manière (algorithme linéaire) cette méthode permet pour une taille de boite similaire et un nombre d'évènements constant de représenter plus fidèlement l'aspect de la distribution expérimental qu'un histogramme classique. On peut observer cet effet sur la Figure 71.

Pour lisser cette courbe nous avons apodisé la boite utilisée (Figure 72). En lissant la forme abrupte de cet élément on obtient ainsi, après convolution, une distribution plus douce qui évite l'effet de marche.

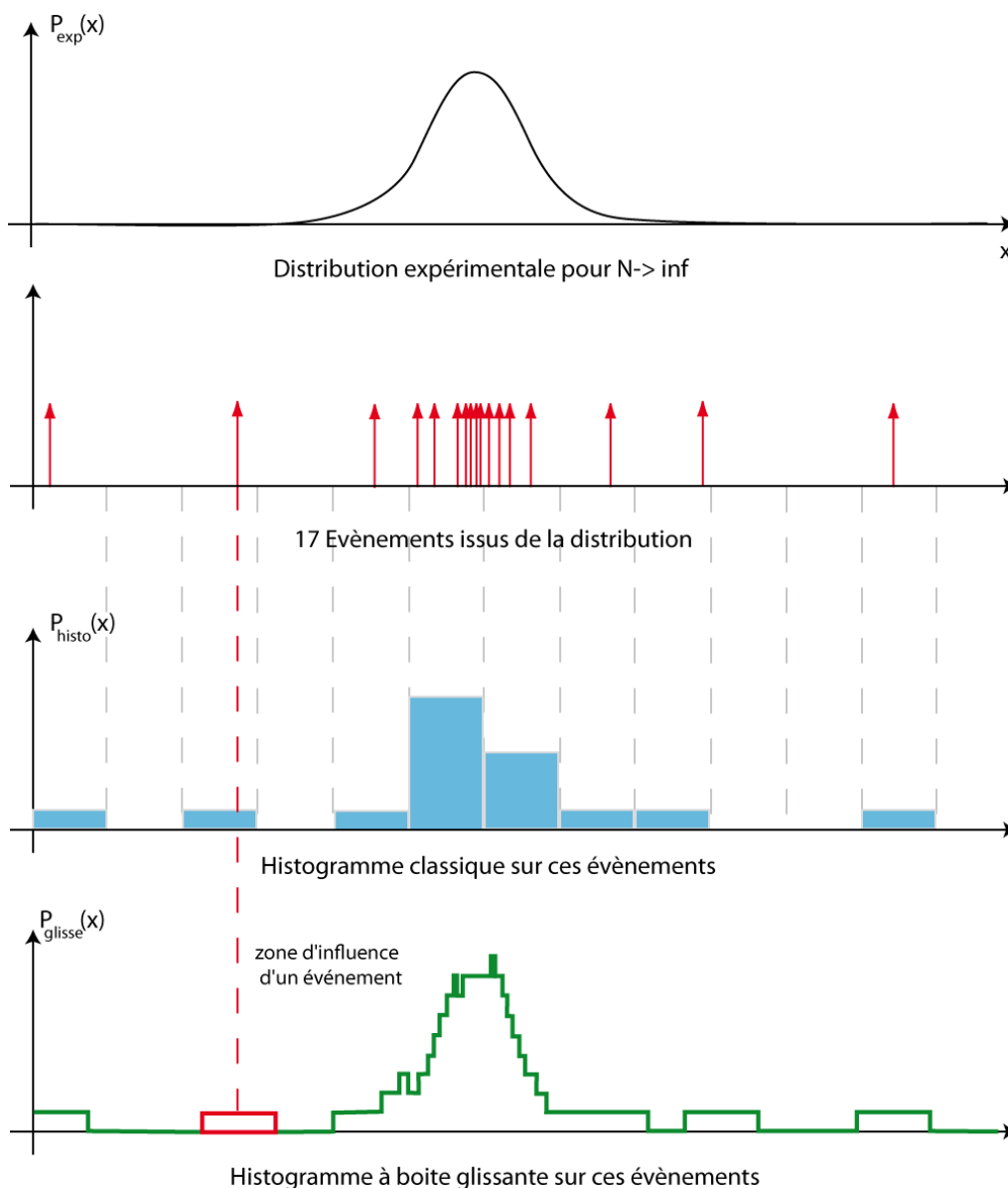


Figure 71 : Représentation d'une distribution avec une boîte glissante

On représente de haut en bas, la distribution de probabilité réelle, 17 événements tirés selon cette loi et correspondant par exemple aux résultats d'une expérience de molécule unique, la représentation sous forme d'histogramme de la densité de probabilité expérimentale, et la représentation sous forme de boîte glissante.

Cette méthode, avantageuse pour représenter nos distributions expérimentales avec un faible nombre d'événements doit être utilisée uniquement dans le cas où l'on ne risque pas de masquer un phénomène qui apparaît à une petite échelle. Le choix de l'apodisation et de la largeur de la boîte dépend donc du paramètre mesuré et de l'absence de parties hautes fréquences dans la distribution de ce paramètre. Dans notre cas nous utilisons une fonction d'apodisation inverse exponentielle, F , qui a la propriété de décroître rapidement. Soit :

$$F(x) = 1 - e^{-(b/x)^4}$$

d'où

$$P(r)_{b.gliss} = \sum_i \delta(x = x_i) \circ F$$

où δ est la distribution delta.

On peut généraliser cette méthode à 2D lorsque chaque évènement correspond à deux valeurs. Dans notre cas par exemple, chaque nucléosome correspond à une longueur complexée d'ADN (L_c) et une position de la dyade par rapport au centre de la séquence d'ADN (ΔL). On obtient alors l'approximation de la distribution expérimentale à deux dimensions. Dans ce cas, l'utilisation d'une boîte glissante est encore plus intéressante comme on peut le voir sur la Figure 73.

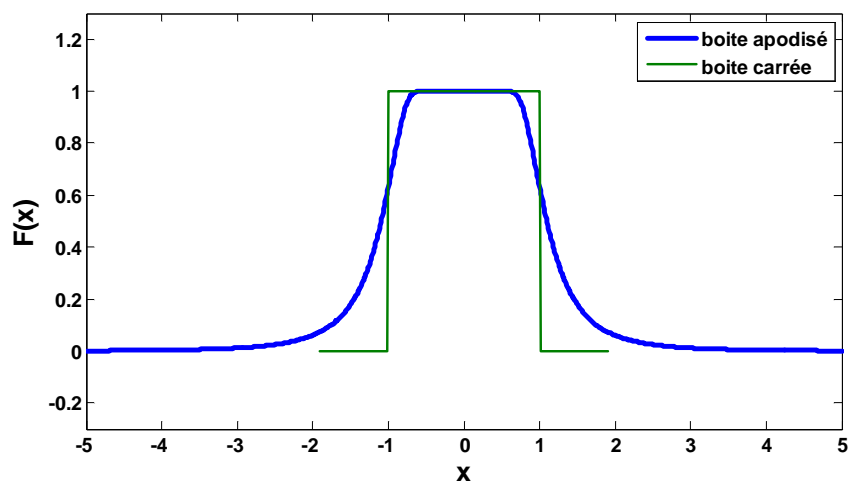


Figure 72 : Exemples boîte glissante avec ou sans apodisation

(en vert) une boîte glissante en forme de fonction porte ; (en bleu) une boîte glissante apodisée.

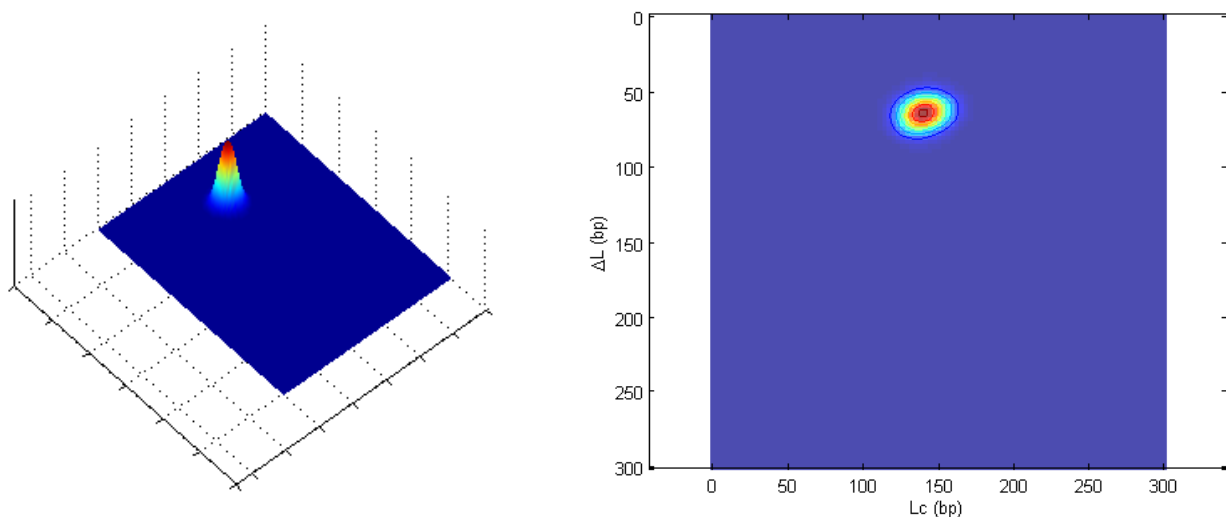


Figure 73 : Exemple de boîte glissante 2D

(à gauche) l'histogramme lissé 2D obtenu avec une boîte glissante carrée. (à droite) le même histogramme vu de dessus.

2.3 Surfaces et déposition de biomolécules

Pour pouvoir visualiser des bio-molécules par AFM, il est tout d'abord nécessaire de réaliser une étape de déposition sur une surface. Un certain nombre de protocoles ont été développés ces dernières années dans le but de réaliser cet accrochage sans perturber la structure des objets à observer. Nous nous intéresserons dans ce qui suit à l'utilisation d'ions métalliques multivalents, de mono-couches auto-assemblées de silanes, de polymères polyélectrolytes cationiques ou encore de bicouches lipidiques supportées.

Mais avant, de s'intéresser au médium qui permettra la liaison du substrat à la surface, considérons la surface elle-même. L'AFM étant une technique de mesure topographique, la rugosité du support va grandement influencer la capacité que nous aurons à distinguer les bio-molécules sur la surface. Les techniques classiques d'analyse d'image qui travaillent directement sur la hauteur pour isoler les objets ne permettent que de repérer des structures dont la hauteur est de l'ordre de la rugosité de surface. En outre, les techniques utilisant le gradient de l'image nécessitent une dynamique en X-Y-Z (c'est à dire un nombre de bits sur le lequel est codé l'information) bien supérieure à celle accessible avec des AFM commerciaux. Du fait de ces contraintes il convient de choisir une surface dont la rugosité est d'environ 1 à 5 Angstroms. On peut trouver commercialement différents types de surfaces correspondants à ce critère : l'or mono-cristallin 111, le silicium mono-cristallin, le HOPG (*Highly Ordered Pyrolytic Graphite*), le quartz et le mica. Ces surfaces sont utilisées sélectivement en fonction de l'application réalisée. Par exemple, le HOPG étant un bon conducteur électrique il est couramment utilisé en microscopie électronique à transmission (ou TEM). L'or 111 quant à lui est utilisé plutôt dans le cadre d'études électrochimiques (Manne *et coll.* 1991). Du fait de son très faible coût et de sa facilité d'utilisation le mica est en général préféré aux autres substrats en microscopie à force atomique pour l'imagerie de bio-molécules. C'est pourquoi nous l'utiliserons nous aussi.

Le Mica est un silicate en feuillet de formule $\text{KAl}_2 [(\text{OH})_2 | \text{AlSi}_3\text{O}_{10}]$. Du fait de son arrangement en plan hexagonaux (Figure 74), le clivage suivant $\{001\}$ est très favorable et il est aisé de cliver un échantillon suivant ce plan. Ceci nous permet de produire des surfaces de mica atomiquement planes de plusieurs millimètres carrés. Fonctionnellement les surfaces ainsi produites présentent des groupes silanols et silanols vicinaux très hydrophiles. Dans les conditions du laboratoire, les surfaces de mica sont donc toujours recouvertes d'une couche d'eau de quelques nanomètres à quelques centaines de nanomètres d'épaisseur. Dans ces conditions les groupes de surfaces sont chargés négativement sous la forme silanolate SiO^- .

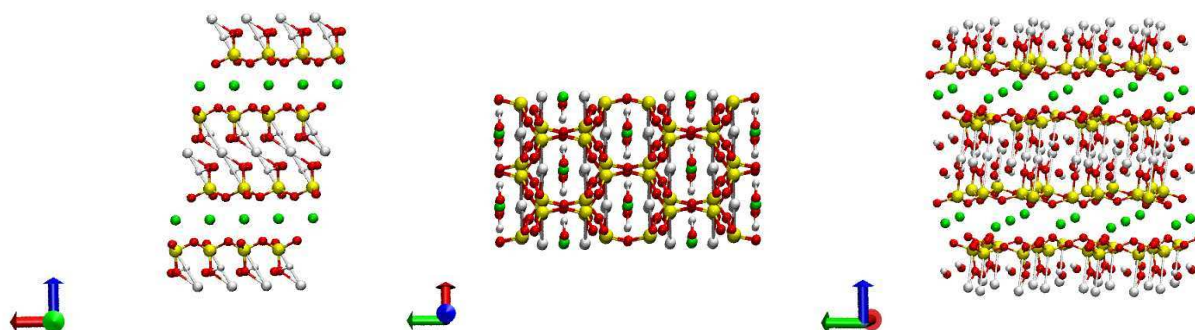


Figure 74 : Structure du cristal de Muscovite (Mica)

(En vert) les atomes de potassium, (en rouge) les atomes d'oxygène, (en jaune) les atomes de silicium et (en blanc) les atomes d'aluminium. Sur les différentes vues en coupe, on remarque l'arrangement en feuillets hexagonaux compacts des tétraèdres de silanolates séparés par les cations potassium.

Généralement, les protocoles d'adsorption de bio-molécules reposent sur un accrochage électrostatique des molécules dans le plan d'observation qui est moins destructeur pour les complexes que la création de liaison covalentes avec la surface. Néanmoins l'ADN étant un polyélectrolyte chargé négativement il convient dans notre cas de modifier soit la polarité du mica soit celle de l'ADN elle-même. Il existe donc deux grands types de protocoles : ceux de fonctionnalisation du mica et ceux utilisant des ions multivalents.

2.3.1 Ions multivalents

L'ajout de cations issus des métaux de transition de degré d'oxydation +II tels que Ni^{2+} , Co^{2+} , Zn^{2+} , Mg^{2+} au tampon permet une adsorption électrostatique des complexes nucléo-protéiques suffisamment forte pour qu'ils puissent être visualisés par AFM. A l'opposé, des ions tels que Mn^{2+} , Cd^{2+} ou Hg^{2+} sont incapables de créer un lien attractif assez robuste. Il est à noter que certains ions trivalents comme le cobalt-hexamine Hex-Co^{3+} peuvent aussi donner lieu à l'adsorption d'ADN (Lindsay *et coll.* 1989; Hansma *et coll.* 1992; Hansma *et coll.* 1992; Hansma *et coll.* 1993; Hansma *et coll.* 1996; Pastre *et coll.* 2003; Pietrement *et coll.* 2005; Pastre *et coll.* 2006; Sorel *et coll.* 2006)

Le mécanisme de l'adsorption de polyélectrolytes anioniques sur une surface également chargée par l'incorporation d'ions multivalents est encore en partie non élucidée même si ce type de phénomène a largement été étudié (Figure 75). On pense généralement que les ions divalents ont tout d'abord tendance à se condenser à la surface du polyélectrolyte ADN. Ensuite, par relargage des contre-ions de la surface (phénomène de déplétion électrostatique) les complexes sont entropiquement confinés vers la surface. Les théories actuelles divergent sur le fait de savoir si c'est bien la corrélation des charges de la surface et du polyélectrolyte qui induit l'adsorption ou si cet accrochage électrostatique est simplement dû à un phénomène de compensation de charge de l'ADN et de la surface par les ions multivalents (Pastre *et coll.* 2003; Cheng *et coll.* 2006; Sushko *et coll.* 2006).

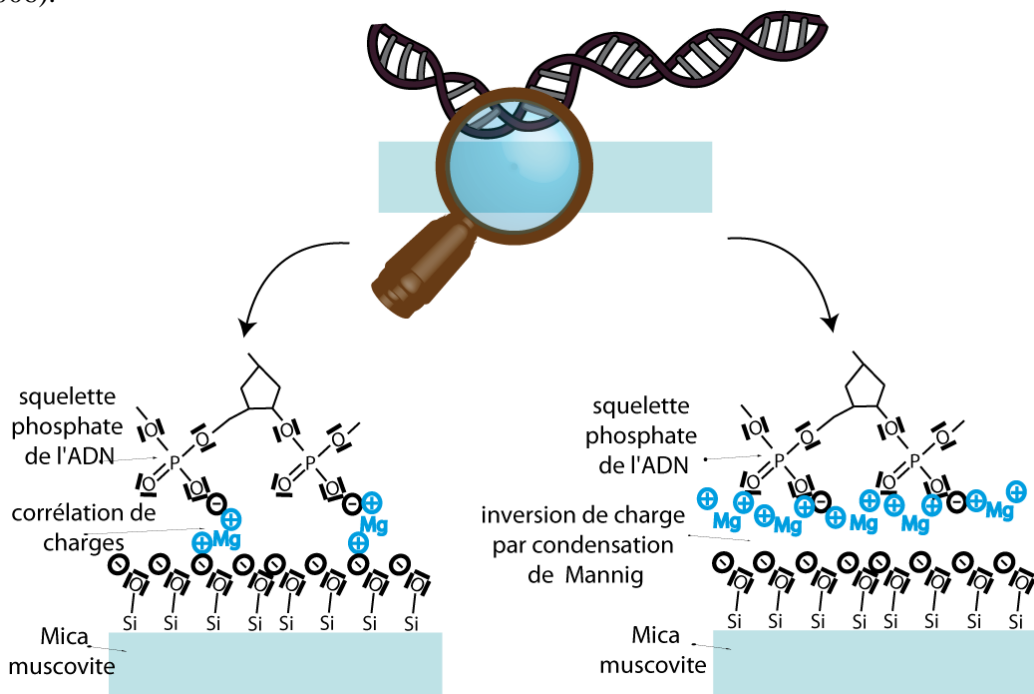


Figure 75 : Mécanismes d'adsorption de l'ADN par les ions magnésium
(à gauche) modèle de corrélation de charges, (à droite) modèle d'inversion de charges.

En ajustant la concentration en ions multivalents il est possible de moduler l'énergie d'interaction entre les complexes nucléo-protéiques et la surface de mica. En milieu liquide, il est par exemple possible de réduire cette interaction de manière suffisante pour que les molécules aient le temps de diffuser dans le plan d'observation entre deux images successives de la même zone (Figure 76). Cela a en particulier permis d'étudier la diffusion lente de molécules d'ADN à 2D dimensions ou la flexibilité de la molécule d'ADN en fonction de la séquence nucléotidique (Scipioni *et coll.* 2002; Marilley *et coll.* 2005), ou la diffusion 1D de l'ARN Polymérase de *E. Coli* lors de la transcription (Guthold *et coll.* 1999)

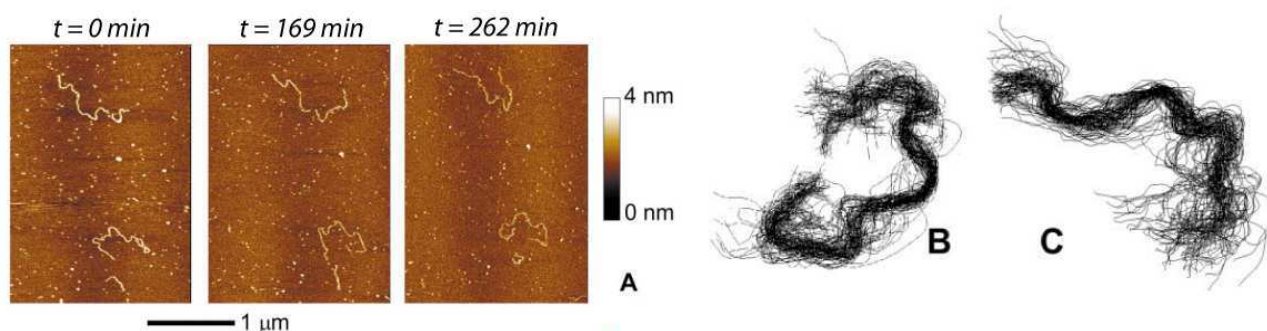


Figure 76 : Diffusion 2D de molécules d'ADN visualisées par AFM

(A) Images AFM de topographie de molécules d'ADN à différents temps. (B et C) superposition du squelette de deux molécules d'ADN observées à des intervalles de 2 minutes. D'après (Scipioni *et coll.* 2002).

En outre, en faisant varier le rapport des concentrations en ions monovalents et divalents lors du dépôt des molécules d'ADN il a été montré que l'on peut distinguer deux régimes d'adsorption. Pour des rapports $[\text{ions divalents}]/[\text{ions monovalents}]^2$ élevés, la molécule est projetée (au sens mathématique) de sa conformation 3D à une conformation 2D hors équilibre (Pastre *et coll.* 2003). Pour des rapports plus faibles la molécule d'ADN a suffisamment de temps pour relaxer vers une conformation 2D à équilibre (Figure 77). Ce protocole de dépôt permet donc en fonction des conditions d'étudier la molécule d'ADN dans différentes situations : équilibre 3D projeté à 2D ou équilibre 2D (Rivetti *et coll.* 1996; Valle *et coll.* 2005; Moukhtar *et coll.* 2007).

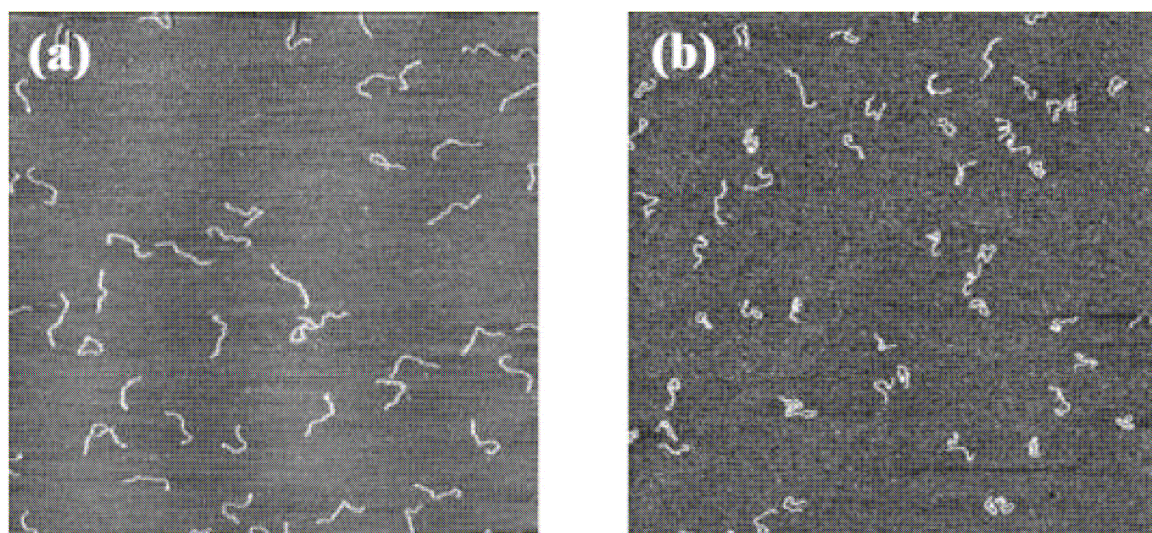


Figure 77 : Images AFM de molécules ADN à l'équilibre 2D ou projetées 3D/2D.

Images AFM de topographie dans l'air de molécules d'ADN pour deux conditions de dépôt différentes un rapport $[\text{ions divalents}]/[\text{ions monovalents}]^2$ (a) ~ 0.65 et (b) ~ 0.95 . On remarque la conformation plus

relâchée à gauche, plus proche des conditions d'équilibre 2D, alors qu'à droite, les molécules sont piégées sur la surface. D'après (Pastre *et coll.* 2003)

Ce protocole est simple et rapide mais il est très dépendant de l'état de charge du mica qui dépend par exemple de l'hygrométrie ambiante. Les dépôts sont donc assez peu reproductibles et, on ne peut pas travailler à des fortes concentrations en ADN ou en complexes. En effet, en présence d'ions divalents, les molécules d'ADN ont tendance à former des réseaux et les complexes des agrégats. D'autre part, il n'est pas possible de travailler à de forces ioniques élevées car elles risquent de déstabiliser le lien entre l'ADN et la surface par écrantage électrostatique (Bustamante *et coll.* 1996).

On remarque également que le fait de condenser des ions divalents sur l'ADN a tendance à le rigidifier (Hackl *et coll.* 2005). Avec la présence de la surface de mica très chargé, ce type de protocole tend par conséquent à déstabiliser les complexes nucléo-protéiques telles que les nucléosomes. Pour la chromatine, ce type de protocole a pu être utilisé avec au préalable une étape de fixation au glutaraldéhyde qui présente l'inconvénient, comme nous le verrons, de modifier la structure de la chromatine. La rigidification de l'ADN a enfin tendance à le raccourcir, ce qui réduit de quelques % le pas de la double hélice d'ADN (Bustamante *et coll.* 1996; Rivetti *et coll.* 2001)

La quantité de molécules adsorbées résulte d'une cinétique limitée par la diffusion, elle est donc fonction de la racine carrée du produit du temps de dépôt et de la concentration initiale. Cela a été vérifié par Bustamante *et coll.* (Rivetti *et coll.* 1996).

2.3.2 Polymères cationiques et spermidine

Un autre moyen de créer une attraction électrostatique entre l'ADN ou les complexes nucléo-protéiques et la surface de mica consiste à modifier directement l'état de charge de surface du mica. Pour ce faire une première technique de fonctionnalisation du mica prépare la surface en déposant au préalable des molécules très chargées positivement comme des polymères cationiques ou de la spermidine (Pisano *et coll.* 2007) (Figure 78). Les molécules couramment utilisées sont la polylysine et la polyornithine (Bussiek *et coll.* 2003; Podesta *et coll.* 2004; Podesta *et coll.* 2005). Dans les deux cas ces polyélectrolytes sont adsorbés à la surface du mica par interaction électrostatique sans présenter d'organisation particulière.

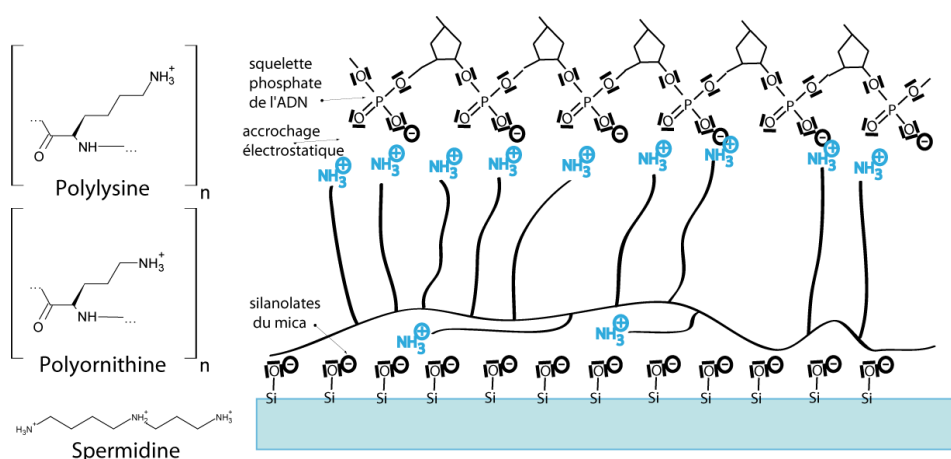


Figure 78 : Mécanisme d'adsorption de l'ADN par les polymères cationiques

(à gauche) les 3 types de molécules les plus couramment utilisées sont la Polylysine, la Polyornithine et la Spermidine. (à droite) le mécanisme d'adsorption de l'ADN sur une surface de mica fonctionnalisée par ces

polymères. La surface étant dans ce cas fortement chargée les molécules d'ADN sont dans la plupart des cas piégées irréversiblement.

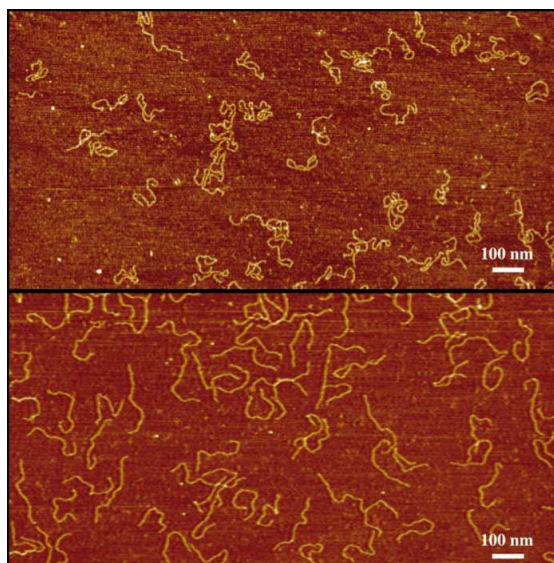


Figure 79 : Effet de la densité en polyornithine sur la conformation de l'ADN déposé. Les molécules d'ADN (896 pb) sont plus compactes pour 100 $\mu\text{g/ml}$ de poly-L-ornithine (*en haut*) que pour 0.018 $\mu\text{g/ml}$ de poly-L-ornithine (*en bas*). D'après (Podesta *et coll.* 2005).

Ce type de protocole est très rapide et permet de déposer des molécules ou des complexes ADN-protéines sur une grande gamme de concentration. Les molécules sont projetées de 3D à 2D sans possibilité de réarrangement du fait de la forte charge positive de la surface. En outre, il est aisé de moduler cette charge en diluant plus ou moins la quantité de polymères que l'on adsorbe à la surface du mica (Podesta *et coll.* 2005) (Figure 79). La rugosité des surfaces PL-Mica ou PO-Mica varie de 0.2 à 0.4 nm selon les cas. La stabilité de ce type de surface est moindre que celle de surface où le mica est modifié chimiquement mais elles peuvent être utilisées pour l'imagerie en environnement liquide. Néanmoins, ces polymères (et en particulier la spermidine) étant connus pour compacter la chromatine en solution il risque de modifier la structure de la chromatine.

2.3.3 Silanes et mica silylés

Un autre type de fonctionnalisation couramment utilisé est la modification covalente de la chimie de surface du mica à l'aide de dérivés de silanes. Dans ce cas on vient faire réagir en phase gazeuse ou aqueuse les groupements silanols libres de la surface de mica avec un composé silanes. Ce type de procédure est très utilisé pour rendre hydrophobes les surfaces de verre (en biologie moléculaire par ex.). Les silanes ainsi déposés comportent en général des chaînes alkyles (de 3 à 20 carbones en général) qui ont tendance à s'aligner sous forme de brosses de polymères, on parle alors de mono-couche auto-assemblée ou SAM pour '*Self Assembled Monolayer*' (Lyubchenko *et coll.* 1996; Shlyakhtenko *et coll.* 1999; Lyubchenko *et coll.* 2001; Gaillard *et coll.* 2002; Lyubchenko *et coll.* 2002; Chandross *et coll.* 2004; Lorenz *et coll.* 2005).

Le mécanisme de la réaction est une succession de deux substitutions qui lient chimiquement le silane au silanol libres du mica (Figure 80). Dans les conditions optimums de réactions on aboutit à une mono-couche de silanes covalamment liés au mica. Néanmoins, en fonction des substituants du silane cette mono-couche comportent plus ou moins de défauts et résiste plus moins bien à l'hygrométrie ou au passage en milieu aqueux. Le défaut principal est la

polymérisation des silanes entre eux qui aboutit à la formation d'agrégats peu stables qui se séparent de la surface par hydrolyse.

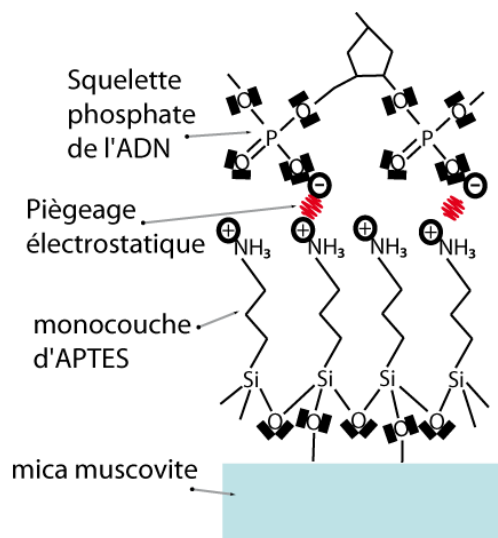


Figure 80 : Mécanismes d'adsorption de l'ADN par une surface AP-mica

De la même manière que pour les polymères cationiques la surface d'AP-mica piège fortement les molécules d'ADN par interaction électrostatique et relargage de contre-ions. Son organisation en monocouche organisée permet d'obtenir une rugosité plus faible.

Le dérivé silane le plus utilisé est l'aminopropyltriéthoxysilane (APTES) et c'est celui que nous utilisons au laboratoire (Lyubchenko *et coll.* 1996; Shlyakhtenko *et coll.* 1999; Yodh *et coll.* 1999; Lyubchenko *et coll.* 2001). Les mono-couches d'APTES présentent des groupes amines chargés à pH neutre. Les surfaces produites que nous appellerons AP-Mica (ou SAM) ont une très bonne affinité pour l'ADN même avec des solutions très diluées ($[DNA]_{\min} = 0.01 \text{ ng}/\mu\text{L}$), sur une grande gamme de température ($0 - 60^\circ\text{C}$) et pour une gamme de forces ioniques assez large (de 0 à 100 mM NaCl). Le principal avantage de ce type de méthode est que l'on ne modifie pas le tampon du complexe est donc qu'on ne modifie pas la structure des biomolécules dans le tube réactionnel. Le mécanisme de dépôt de l'ADN sur ces surfaces est le même que pour des protocoles utilisant des fortes concentrations de polymères cationiques: on piège les molécules d'ADN de 3D à 2D en les projetant sans qu'elles aient le temps de se réorganiser dans le plan d'observation. L'accrochage, lui aussi électrostatique et entropique, est dû au relargage des contre-ions de surface.

Il faut noter qu'un défaut majeur de ce type de silane est qu'il a tendance à se déstabiliser si l'on utilise en imagerie liquide. Un autre type de silane a donc été développé par Lyubchenko *et coll.* (Shlyakhtenko *et coll.* 2003): le 1-(3-aminopropyl)silatrane. Ces silanes sont plus stables mais moins réactifs chimiquement que les trialkoxysilanes (comme l'APTES) du fait de la forte interaction donneur-accepteur en l'azote et le silicium qui ralentit le processus d'hydrolyse. Ceci prévient donc la création d'agrégats de silanes en milieu aqueux. Cependant, comme nous ne travaillerons pas dans ce qui suit en milieu aqueux pour l'imagerie ce phénomène d'hydrolyse ne sera pas vraiment gênant et nous pourrions utiliser l'APTES.

Le protocole que nous utilisons pour préparer les surfaces AP-Mica est le suivant. On place des lames de mica fraîchement clivées dans un dessiccateur contenant 2L d'Argon et $\sim 50 \mu\text{L}$ d'APTES sous forme liquide. On laisse réagir pendant 2h. On stocke les surfaces ainsi produites dans une boîte à humidité contrôlée (RH $\sim 25\%$) où l'on peut les conserver une semaine environ. Pour diminuer le nombre de défauts dans la mono-couche, éliminer l'eau interstitielle entre la mono-couche et le mica et donc stabiliser la fonctionnalisation nous plaçons enfin les surfaces AP-mica à 70°C pendant 4-5h.

Le protocole d'adsorption des biomolécules consiste à déposer une goutte de quelques microlitres de mélange sur une de ces surfaces pendant une minute, à rincer avec un millilitre d'eau ultrapure et à sécher sous un flux modéré d'azote pendant quelques secondes. La quantité de molécules adsorbées étant une cinétique limitée par la diffusion, elle est fonction de la racine carrée du produit du temps de dépôt et de la concentration initiale.

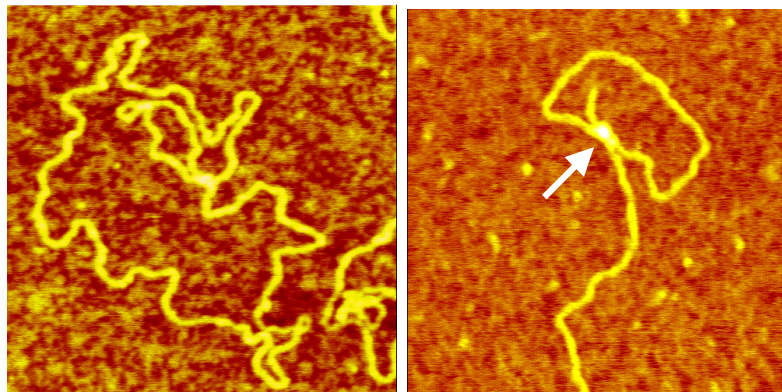


Figure 81 : Exemple d'images AFM d'ADN et de complexes nucléo-protéiques déposés sur AP-mica

Images AFM dans l'air de (à gauche) un ADN circulaire relâché d'environ 3500 pb, et (à droite) un ADN télomérique formant une boucle fixée par la protéine télomérique TRF2. Dans les deux cas, les molécules ont été déposées sur une surface de mica fonctionnalisée par des silanes APTES (AP-mica). Echelle : X/Y : 500 x 500 nm. Echelle Z : 2 nm.

La rugosité des surfaces ainsi produites est de l'ordre de 0.1-0.3 nm ce qui permet de discerner très nettement les complexes nucléo-protéiques sur la surface (Figure 81).

2.3.4 Mono/Bi-couches lipidiques supportées

La dernière méthode utilisée pour observer des bio-molécules par AFM est l'emploi de couches lipidiques supportées sur du mica. Pour obtenir des mono/bi-couches lipidiques visualisables en AFM, il existe deux techniques : soit on les reconstitue (en faisant fondre des liposomes) sur une surface d'or 111 fonctionnalisée par des thiols (Naumann *et coll.* 2003) ou en transférant une membrane reconstituée sur un support de silicium mono-cristallin silylé (Maaloum 2003), soit on purifie des membranes natives que l'on dépose sur des lames de mica fraîchement clivées à forte force ionique (Scheuring *et coll.* 1999; Scheuring *et coll.* 2001; Scheuring *et coll.* 2003; Scheuring *et coll.* 2003).

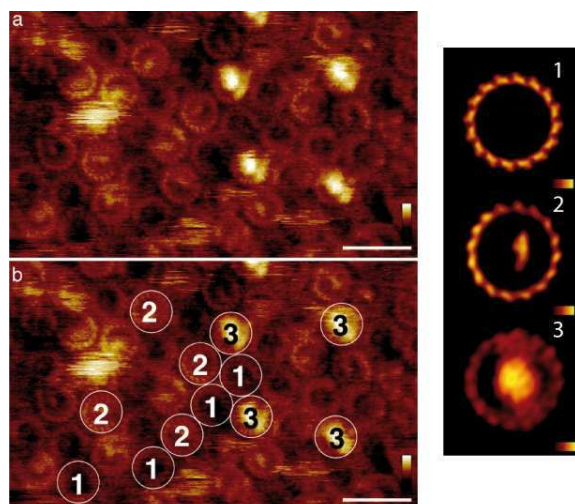


Figure 82 : Images de protéines membranaires photosynthétiques à très haute résolution.

(a) Images AFM de topographie en mode contact de complexes photo-synthétiques déposés dans leur membrane native et fixés sur le mica à haute force ionique. Echelle X/Y : barre de 20nm. Echelle Z : de 0 nm (en noir) à 5 nm (en blanc). (b) mise en évidence de trois types de complexes : 1, le complexe LH1 vide ; 2 le complexe LH1 avec RC inséré ; 3 le complexe complet. (c) Image AFM moyennées de ces trois types de complexes. D'après (Scheuring *et coll.* 2003a).

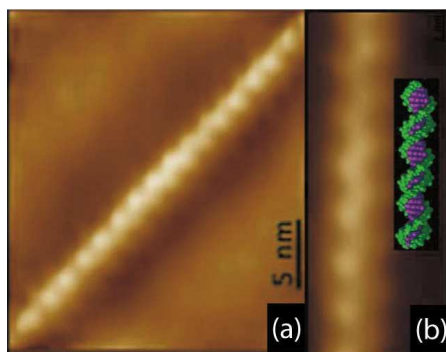


Figure 83 : Image AFM de topographie d'une molécule d'ADN adsorbée sur une bicouche lipidique.

Si l'on dépose en solution des molécules d'ADN sur une mono-couche de lipides supportés par un liquide et que l'on transfère cet assemblage sur une surface de silicium ultraplate il est possible d'imager en AFM à haute résolution les molécules d'ADN très fortement fixées et d'observer l'hélicité droite et le pas de la double hélice d'ADN. D'après (Maaloum 2003).

Ce type de support est utile pour visualiser des molécules trans-membranaires ou des protéines très fragiles. Il possède une très forte charge de surface et peut, par exemple, permettre de déposer très solidement des molécules d'ADN en vue d'imager celles-ci avec une très haute résolution (Mou *et coll.* 1995; Maaloum 2003) (Figure 83).

Du fait de la difficulté à manipuler les membranes lipidiques, ce type de protocole est néanmoins utilisé seulement pour des applications très particulières.

2.4 Conditions expérimentales d'acquisitions des images AFM

Au vu de ce qui précède, le meilleur compromis entre l'obtention d'une résolution importante, la conservation de la structure des biomolécules et l'obtention de grande quantité d'images permettant de tirer partie de notre analyse d'image est d'utiliser le mode contact intermittent et de déposer les complexes nucléo-protéiques sur une surface d'AP-mica.

Pour réaliser les expériences décrites dans les chapitres 3 à 6, nous avons utilisé un microscope à force atomique Nanoscope III de Digital Instruments (Veeco Instruments, Santa Barbara, CA) associé à scanner de type E (de 10 μm de côté). Nous avons réalisé des images de AFM de topographie de 1 par 1 μm à une fréquence de balayage de 2 Hz. Pour chaque zone nous avons réalisé une pré-image non sauvegardée de 1 micron sur l'axe rapide par 660 nm sur l'axe lent pour stabiliser le système avant l'enregistrement. Nos mesures ont été effectuées en mode contact intermittent dans l'air à l'aide de pointes DLCS (pour *Diamond Like Carbon Spikes*) présentant des pics de carbones de plus de 25 nm de haut et dont le rayon terminal est compris entre 1 et 3 nm. La

fréquence d'excitation utilisée dans ce cas est de ~150 kHz selon le lot de pointes et l'amplitude d'excitation est d'environ 50 nm.

Les images brutes contiennent 512 par 512 pixels avant sur-échantillonnage en images de 1024 par 1024 pixels. Les seuils de hauteur choisis sont pour l'ADN de 0.2 nm et pour les nucléosomes de 1.25 nm.

Nous avons choisi de réaliser l'imagerie dans l'air en non en liquide du fait de la meilleure résolution latérale et verticale (bruits thermiques) et pour pouvoir acquérir un grand nombre d'images sur le même échantillon. En outre, les techniques actuelles d'AFM en liquide ne permettent pas d'imager la dynamique du nucléosome sans altérer sa stabilité (conditions salines très basses) et sont donc réduites à acquérir des vues statiques comme nous le ferons avec l'imagerie dans l'air.

3 À l'équilibre : Les mono-nucléosomes

Le nucléosome possède une structure complexe et fortement dynamique, et il a été observé que pour une séquence d'ADN donnée, la position de l'octamère pouvait changer relativement à la séquence ADN (Meersseman *et coll.* 1992; Flaus *et coll.* 2003; Flaus *et coll.* 2003; Flaus *et coll.* 2004; Stockdale *et coll.* 2006) et que la longueur d'ADN enroulée autour de l'octamère d'histones pouvait également fluctuer significativement dans le temps (Polach *et coll.* 1995; Widom 1997; Wu *et coll.* 2004; Li *et coll.* 2005; Tomschik *et coll.* 2005; Tomschik *et coll.* 2008). Nous avons donc choisi de mesurer simultanément les paramètres de longueur complexée et de position du nucléosome. Dans la partie qui suit, nous avons tout d'abord abordé l'étude de complexes nucléo-protéiques à l'équilibre thermodynamique. Nous traiterons ensuite de quelques facteurs susceptibles d'influencer la distribution de longueur complexée et la position du nucléosome comme la longueur des bras d'ADN, la composition en histone du nucléosome (tétramère seul, octamère variant) ou la présence de l'histone de liaison H1. Enfin, nous proposons un modèle simple permettant d'extraire des paramètres énergétiques comme l'énergie nette de liaison histone-ADN à partir de la distribution de longueur d'ADN complexée, que nous comparons aux données de la littérature.

3.1 Les mono-nucléosomes conventionnels

3.1.1 Premières cartes $L_c/\Delta L$ et autres paramètres

Nous avons voulu vérifier si la longueur des bras d'un mono-nucléosome ou leur asymétrie pouvait influencer l'efficacité du positionnement de la séquence 601 et/ou la longueur d'ADN enroulé autour des histones. Pour ce faire, nous avons comparé les distributions de position et de longueur d'ADN complexé aux histones pour deux types de mono-nucléosomes reconstitués sur des constructions d'ADN contenant la séquence positionnante 601 : avec deux bras courts de même longueur (52 et 56 pb, total 255 pb) ou avec deux bras longs de longueur différente (82 et 127 pb, total 356 pb) (Figure 84).

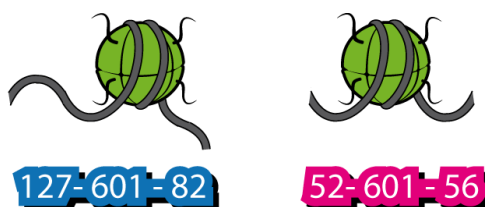


Figure 84 : Constructions nucléosomales utilisées

(à gauche) Nucléosomes positionnés, asymétriques et longs avec 127 pb et 82 pb pour les bras d'ADN. (à droite) Nucléosomes positionnés, symétriques et courts avec 52 pb et 56 pb pour les bras d'ADN. Ces deux types de nucléosomes sont positionnés grâce à la séquence 601 (Lowary *et coll.* 1998)

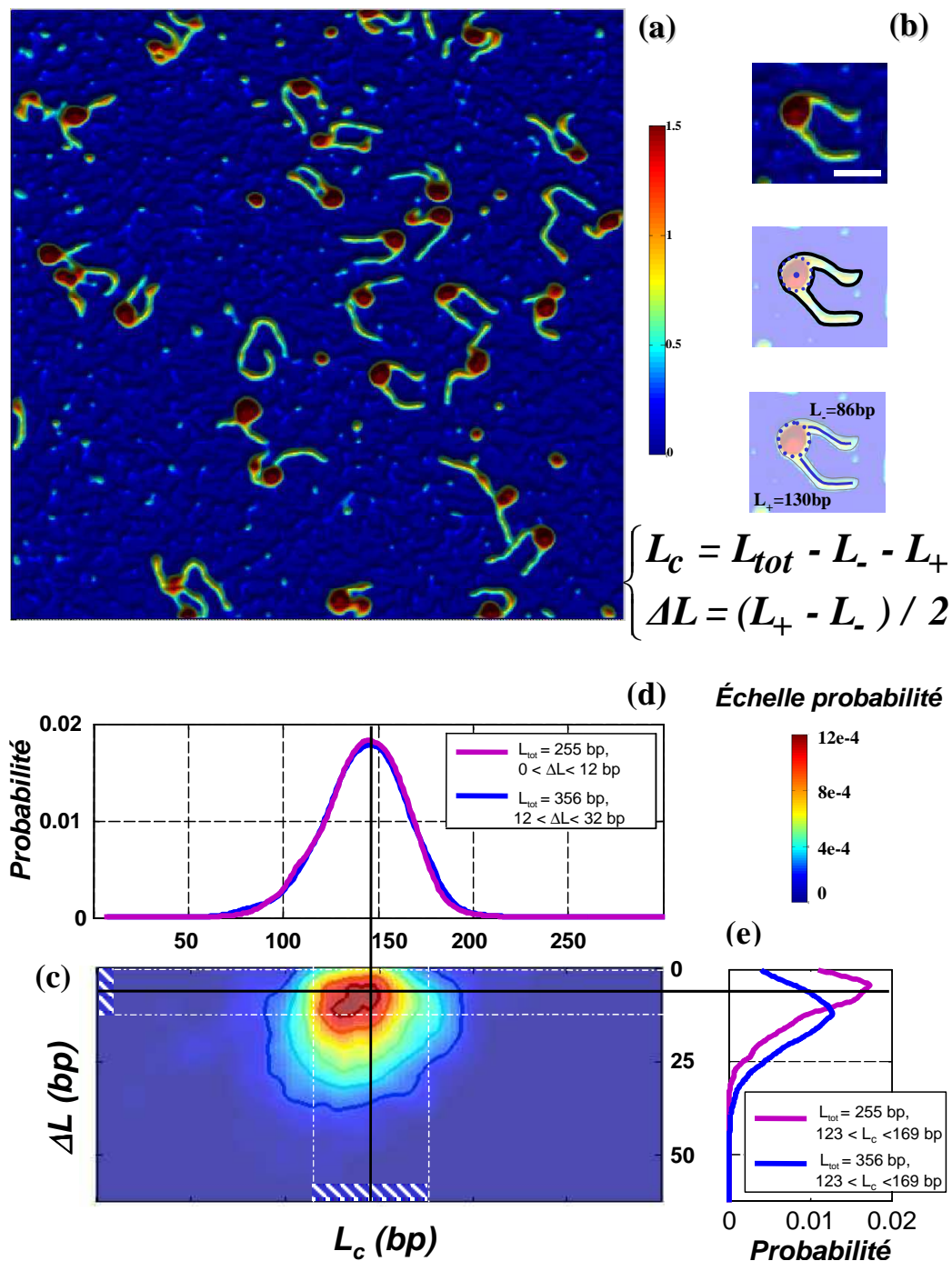


Figure 85 : Nucléosomes conventionnels et cartes $L_c/\Delta L$

(a) Image AFM de mono-nucléosomes positionnés. Echelle X/Y : 500 nm. Echelle Z : fausses couleurs de 0 (bleu foncé) à 1.5 nm (rouge). L'ADN apparaît en vert, les NCPs en rouge et la surface AP-mica en bleu foncé. La reconstitution n'étant pas totale on remarque des ADN libres. (b) En haut : zoom sur un nucléosome. Au milieu : extraction du contour du nucléosome (trait plein noir), du centroïde du NCP (point bleu) et exclusion du NCP (trait pointillé bleu). En bas : Squelettisation des bras et détermination de la longueur du bras le plus long L_+ et du bras le plus court L_- (c) Histogramme 2D (ou carte) $L_c/\Delta L$ pour les nucléosomes courts dans l'état (α) (d) Projections sur l'axe des longueurs complexées L_c des événements tels que $0 \leq \Delta L \leq 12$ pb pour les nucléosomes courts et tels que $12 \leq \Delta L \leq 32$ pb pour les nucléosomes longs (e) Projections sur l'axe des position ΔL des événements tels que $123 \leq L_c \leq 169$ pb. Notons que nous n'avons pas pris en compte dans l'analyse les nucléosomes apparaissant avec un seul bras, appelés (α -faux-1-bras) (voir section 3.1.2.4).

La reconstitution des nucléosomes sur ces fragments d'ADN positionnants se fait par dialyses successives dans des bains à concentration en NaCl décroissantes. On mélange initialement de l'ADN avec les histones dans un ratio 1:2 dans un tampon dénaturant contenant de 2 M de NaCl, puis on dialyse lentement (sur une journée + une nuit) dans des solutions de plus en plus diluées en sel, pour finir dans un tampon Tris 10mM EDTA 1mM contenant 10 mM NaCl. Les nucléosomes peuvent être conservés ensuite à 4°C pendant plusieurs jours dans ce tampon.

Ils peuvent être ensuite déposés sur la surface AP-mica après une dilution 1:10 dans un tampon TE 10 mM. Après une minute d'incubation, la surface est rincée à l'eau et séchée par un flux d'azote. Ils sont alors prêts à être visualisés dans l'air par AFM (Figure 85a).

L'imagerie AFM des mono-nucléosomes déposés sur la surface combinée à l'analyse systématique des images AFM à l'aide d'un script MATLAB utilisant des outils morphologiques (dilatation, squelettisation, seuillages à hystérésis, cf. chapitre '2. Méthodes') permettent de mesurer très précisément la longueur des 2 fragments d'ADN qui sortent du nucléosome (notées respectivement L_+ et L_- pour le bras le plus long et le plus court, cf section 2.2). A partir de la longueur mesurée de chacun des deux bras d'ADN du mono-nucléosome, nous obtenons la longueur d'ADN organisée par l'octamère d'histones ($L_c = L_{tot} - L_+ - L_-$) ainsi que la position de la dyade du nucléosome par rapport au centre de la séquence ($\Delta L = (L_+ - L_-)/2$). En toute rigueur, nous mesurons ainsi la position médiane de l'ADN en contact direct avec le nucléosome qui correspond, si l'ouverture est symétrique, à la dyade du nucléosome (Figure 6).

Ces deux variables structurales du nucléosome (L_c et ΔL) étant couplées, il est intéressant de les représenter par un histogramme à 2 dimensions $L_c / \Delta L$ en utilisant une boîte glissante à 2D (cf. section 2.2.6) d'une largeur (8 pb) proche de notre résolution expérimentale (Figure 85). Dans la suite, on appellera état (α) la configuration représentée par cette carte c'est à dire la situation à l'équilibre et nous verrons dans le chapitre 5 que d'autres états peuvent apparaître lors de l'action de facteurs de remodelage comme RSC ou SWI/SNF.

Il est également possible de projeter cette carte 2D sur chacun de ses axes. Considérons tout d'abord les nucléosomes courts symétriques (255 pb) : si nous sélectionnons les nucléosomes 'bien positionnés' c'est-à-dire dont la position est en accord avec celle attendue par construction du fragment d'ADN (contenant la séquence 601 positionnante) utilisé pour la reconstitution ($0 \text{ bp} < \Delta L < 12 \text{ pb}$), nous obtenons la distribution de longueur d'ADN complexé de la Figure 85d, (trait violet). Cette distribution présente un maximum de probabilité pour une longueur $L_c^* = 146 \pm 2 \text{ pb}$ en parfait accord avec la structure cristallographique du nucléosome (147 pb, (Luger *et coll.* 1997)) et des mesures par cryo-microscopie électronique (Doyen *et coll.* 2006). La largeur de cette distribution ($\sigma_{L_c} = 23 \text{ pb}$) peut être expliquée par différentes conformations d'enroulement du nucléosome. Nous verrons, dans la section 3.2, comment on peut relier cette dispersion à l'énergie d'interaction histone-ADN.

Nous avons utilisé la même approche pour tracer (Figure 85d, trait bleu) la distribution de longueur complexée des nucléosomes longs et asymétriques (356 pb) qui sont bien positionnés ($12 \text{ bp} < \Delta L < 32 \text{ pb}$). Cette distribution n'est pas discernable de celle obtenue pour les mono-nucléosomes courts et symétriques (255 pb) ce qui montre que la longueur d'ADN des bras n'affecte pas de manière significative la longueur de complexation de l'ADN autour des histones ainsi que ses fluctuations de longueur.

Nous avons ensuite sélectionné les mono-nucléosomes ayant une longueur d'ADN associé aux histones appartenant à l'intervalle ($L_c^* \pm \sigma_{L_c}$ soit $123 \text{ pb} < L_c < 169 \text{ pb}$) où σ_{L_c} est l'écart type de la distribution de L_c déterminée précédemment ($\sigma_{L_c} \sim 23 \text{ pb}$ pour les deux types de mono-nucléosomes) pour tracer leur distribution de position (Figure 1e, traits violet et bleu). Le maximum

de chacune des distributions (9 ± 2 pb et 24 ± 2 pb) est proche de la valeur attendue par construction du fragment d'ADN (2 pb et 22 pb pour les nucléosomes courts et longs respectivement). Il semble que la distribution de position des mono-nucléosomes longs soit plus large que celle des nucléosomes courts. Cependant, lorsque l'on corrige les artéfacts inhérents à l'attribution de L_+ et L_- (c'est à dire la perte d'information liée à l'orientation de chacun des bras qui implique que ΔL est une mesure de distance au centre du fragment ADN) ces deux distributions de position ont une largeur à mi-hauteur semblable (Figure 86).

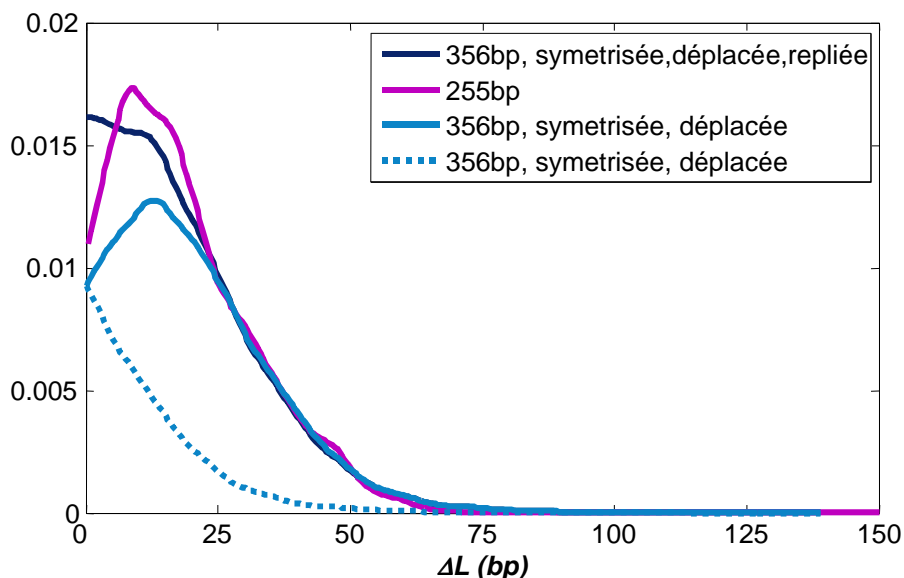


Figure 86 : Repliement des distributions de position

Il est possible de tester l'effet de la longueur des bras ADN sur la largeur de la distribution de position en utilisant les distributions de position expérimentales. Nous avons reconstruit la distribution que l'on aurait obtenue pour les nucléosomes courts et symétriques en étendant, symétrisant et repliant la distribution expérimentale obtenue pour les nucléosomes longs et asymétriques. Au terme de ces opérations on remarque une très grande ressemblance entre la courbe expérimentale pour les nucléosomes courts (trait rose) et la courbe reconstruite (trait bleu foncé). Ceci tend à montrer que si l'on prend en compte l'effet de repliement (c'est à dire la labellisation L_+ / L_-) les distributions expérimentales de position ont la même largeur pour différentes positions de la séquence positionnante 601 sur le fragment d'ADN.

Cette largeur, supérieure de 20 pb à ce que l'on peut s'attendre pour un positionnement par une séquence telle que le 601, peut avoir plusieurs origines physiques parmi lesquelles : le désenroulement asymétrique de l'un des deux bras du nucléosome qui conduit à une erreur sur la détermination de la position de la dyade, l'incertitude de la mesure AFM liée au caractère fini de la pointe, ou un effet de surface. Il est à ce stade impossible de déterminer la contribution de chacun de ces phénomènes, néanmoins nous verrons dans ce qui suit que nous pouvons simuler la forme des cartes 2D $L_c/\Delta L$ en utilisant un nombre restreint d'éléments dont la désynchronisation d'ouverture de chacun des bras d'ADN.

Nous montrons ainsi que la mesure par AFM couplée à l'analyse d'image automatique donne des estimations comparables avec d'autres méthodes à la fois pour la position mais aussi la longueur d'ADN complexé pour des mono-nucléosomes 601. De plus, notre approche expérimentale ne montre aucun effet de la longueur des bras sur la distribution de position ou de probabilité d'enrouler une certaine longueur d'ADN autour des histones.

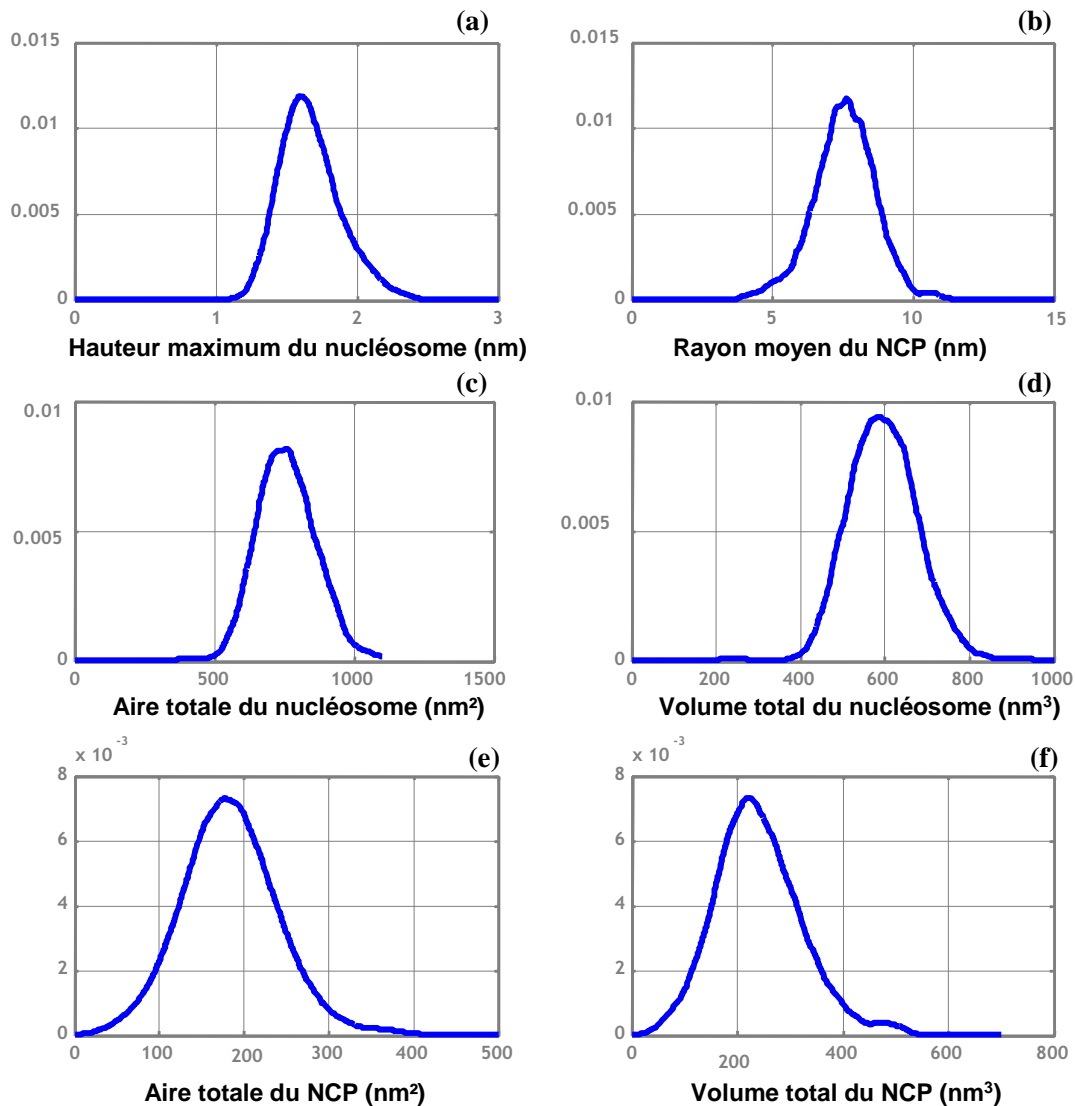


Figure 87 : Paramètres additionnels des mono-nucléosomes

L'analyse d'image permet d'accéder à d'autres paramètres caractérisant la structure des mono-nucléosomes étudiés. Nous représentons les distributions de probabilité de certains d'entre eux.

Sur ces même nucléosomes il est également possible de mesurer des paramètres additionnels comme l'aire du nucléosome, du NCP, leurs volumes et la hauteur moyenne et la hauteur maximale du nucléosome (Figure 87):

a) La hauteur maximale du nucléosome est relativement basse (1.6 nm pour 5 nm dans la structure cristallographique). Elle est due principalement aux conditions d'imagerie comme expliqué dans la partie '2. Méthodes' et en particulier à la différence d'adhésion de la pointe sur la surface AP-mica par rapport à l'ADN ou au nucléosome. Il est à noter que toutes les études AFM sur ce type de surface trouvent une hauteur similaire (de 1.5 à 2 nm) (Yodh *et coll.* 1999; Yodh *et coll.* 2002).

b) Le rayon du NCP (7.5 nm en moyenne) est en très bon accord avec la dilatation d'un objet de 5.5 nm de rayon par une pointe de 3 nm de rayon (cf. section 2.1.3.3). On la calcule à partir de l'aire du NCP A_{NCP} et en supposant que ce dernier est de forme cylindrique par $R = \sqrt{A_{NCP}/\pi}$

Par ailleurs, on mesure également les paramètres suivants qui peuvent être utiles pour la sélection des objets présent sur l'image :

- c) L'aire du NCP
- d) Le volume du NCP
- e) L'aire totale du nucléosome qui est l'aire occupée par le NCP et l'ADN
- f) Le volume total du nucléosome qui est le volume occupé par le NCP et l'ADN

3.1.2 Etalonnage de la méthode d'analyse et des cartes $L_c/\Delta L$

Dans cette partie nous nous intéressons à l'étalonnage de notre méthode automatique d'analyse d'image. Pour quantifier la fonction d'instrument de cette étape nous avons choisi de créer des images AFM synthétiques à partir d'un modèle très simple de nucléosome et d'interaction pointe-surface. Avec cette approche nous pouvons contrôler exactement les paramètres des objets constituant l'image et donc tester l'influence de différents paramètres comme la rugosité de la surface, la longueur de persistance de l'ADN, la corrélation entre les deux bras libres du nucléosome, le déroulement de l'ADN nucléosomal lors de l'ouverture ou encore la taille de la pointe sur le résultat de l'analyse d'image.

Nos images synthétiques sont formées sur un réseau de 512 pixels \times 512 pixels (représentant une zone de $1\mu\text{m} \times 1\mu\text{m}$) en deux étapes distinctes :

- la construction d'un fond rugueux réalisé à partir d'un bruit blanc d'amplitude A_{bruit} sur lequel sont posés des mono-nucléosomes formés d'une partie hémisphérique de $R_{\text{nuc}} = 5.5 \text{ nm}$ de rayon (le NCP) et deux cylindres de rayon $R_{\text{DNA}} = 1 \text{ nm}$ (les bras libres de l'ADN) de longueur l_1 et l_2 .
- La dilatation morphologique de cette surface par une pointe AFM simplifiée représentée par un élément structurant 3D sphérique de rayon R_{pointe} (section 2.2.1.3)

En pratique, on crée le fond rugueux en créant une matrice carrée $IMG(i,j)$ de 512 par 512 cases dont les valeurs sont le résultat du tirage d'une variable aléatoire uniforme d'amplitude A_{bruit} . On positionne ensuite aléatoirement le centroïde de N nucléosomes, autour desquels on construit le NCP et les bras libres de l'ADN en additionnant ces structures à IMG .

$$IMG(i, j) = \underbrace{A_{\text{bruit}}}_{\text{Surface rugueuse (AP-mica)}} + \underbrace{\sum_{k=1}^N z_{\text{NCP}}(i-i_k, j-j_k)}_{\text{Partie NCP}} + \underbrace{\sum_{k=1}^N z_{\text{DNA}_1}(i-i_k, j-j_k, \theta_k^{(1)}, l_k^{(1)}) + \sum_{k=1}^N z_{\text{DNA}_2}(i-i_k, j-j_k, \theta_k^{(2)}, l_k^{(2)})}_{\text{Partie ADN}}$$

$$\text{où } \begin{cases} z_{\text{NCP}}(i, j) = \begin{cases} \sqrt{R_{\text{nuc}}^2 - i^2 - j^2}, & \text{si } R_{\text{nuc}} > \sqrt{i^2 + j^2} \\ 0, & \text{sinon} \end{cases} \\ z_{\text{DNA}_{1/2}}(i, j, \theta, l, l_p) = \begin{cases} 2, & \text{si } (i, j) \text{ appartient au polymère sur réseau de longueur } l, \text{ d'orientation } \theta \\ & \text{et de longueur de persistance } l_p. \\ 0, & \text{sinon} \end{cases} \end{cases}$$

Comme on le voit dans cette définition, l'image *IMG* est donc la somme des contributions issues des différents nucléosomes, chacun de ces derniers étant constitué d'une partie ADN filiforme à notre échelle et d'une partie NCP hémisphérique.

Pour déterminer le trajet des bras ADN, on fait l'approximation d'un comportement gaussien. Pour ce faire, on tire aléatoirement l'orientation de chacun des monomères avec une distribution normale pour les incréments angulaires. C'est un modèle 2D puisque nos images AFM indiquent que l'ADN se place bien dans le plan de la surface AP-mica.

Dans une deuxième partie, on calcule l'image dilatée en niveau de gris de *IMG* avec pour élément structurant une sphère de rayon R_{pointe}

$$IMG_{dilaté} = IMG \oplus S_R$$

où $S_{R_{pointe}}$ est une sphère de rayon R_{pointe} et \oplus l'opérateur de dilatation morphologique.

Comme nous l'avons vu dans la section 2.2.1.9, cette opération morphologique reproduit exactement l'effet du balayage de la pointe AFM en contact avec une surface donnée. Elle rend compte en particulier de l'élargissement effectif des objets observés sur les images AFM.

Les images dilatées ainsi produites (exemples Figure 88) sont alors analysées à l'aide du même programme d'analyse que les images AFM expérimentales de mono-nucléosomes (décrit dans le chapitre 2).

En résumé, ces deux étapes nous permettent donc de construire un ensemble d'images AFM synthétiques à partir desquels nous pouvons tester l'effet de nombreux paramètres sur la résolution de notre analyse d'image. Dans un premier temps nous étudierons l'effet de la fluctuation d'ouverture des mono-nucléosomes. Ensuite, nous allons tester l'effet de la longueur de persistance l_p de l'ADN des bras libres des nucléosomes, puis celui de la corrélation entre angle d'ouverture et allongement des bras. Enfin nous montrerons que l'on peut rendre compte des cartes expérimentales $L_c/\Delta L$ qu'en supposant une absence de synchronisation lors du déroulement de chacun des bras.

3.1.2.1 Effet de la flexibilité de l'angle d'entrée sortie

Nous avons tout d'abord testé ce qui se passe lorsque l'angle d'ouverture des deux bras n'est plus une quantité fixe mais peut fluctuer. Pour ce faire, nous avons construit des nucléosomes virtuels dont l'angle peut varier selon une distribution normale centrée sur $\pi/2$ et d'écart type variable. Néanmoins, à la différence des nucléosomes réels, nous n'avons pas couplé l'ouverture des bras avec un rallongement de ceux-ci. En effet, dans un nucléosome réel, comme 1.75 tours d'ADN font 147 pb (soit 84 pb pour 2π), ces deux paramètres sont couplés de manière linéaire lors du déroulement de l'ADN nucléosomal : $l_{1,2} \propto (84 / 2\pi) \times \theta$. Dans le cas simplifié, on ne prend pas en compte cet effet dans un premier temps, tout ce passe donc comme si les bras pivotaient l'un par rapport à l'autre autour d'un axe fictif passant par le centre du NCP. De plus, on considère ici que $l_p = \infty$, c'est à dire que les brins d'ADN sont des bâtonnets rigides.

Nous avons testé deux cas principaux : $\sigma_\theta = 0$ et $\sigma_\theta = \pi/2$. Les cartes 2D de la Figure 89a et Figure 89b présentent le résultat de ces simulations pour $l_1 = 30 \text{ nm} \sim 88 \text{ pb}$, $l_2 = 50 \text{ nm} \sim 147 \text{ pb}$ d'où $\Delta L = 29 \text{ pb}$ et $L_c = 147 \text{ pb}$. On remarque clairement que dans les deux cas l'état (α) est toujours beaucoup plus localisé que sur les cartes expérimentales (exemple Figure 89f, pour une position différente du nucléosome $\Delta L \sim 9 \text{ pb}$). On remarque également que la fluctuation d'angle d'ouverture n'interfère pas avec la mesure des bras et que le diamètre de l'état (α) reste le même. Cependant, pour de grandes fluctuations les deux bras se joignent et le script d'analyse ne sépare plus les deux bras. On aboutit alors à des événements placés sur la diagonale $L = 0$ (le script ne

détecte qu'un seul bras qu'il nomme L_+) et à une position $\Delta L = L_+ = L_+(\alpha)$. On nommera ce type d'état (α -faux-1-bras), et ces nucléosomes 'faux-1-bras' peuvent être observés sur les images AFM (Figure 88) et les cartes 2D (Figure 89) de nucléosomes synthétiques et de nucléosomes réels.

3.1.2.2 Effet de la longueur de persistance L_p

En conservant cette ouverture fluctuante, comparons ensuite ce que nous obtenons après analyse des images pour un polymère ADN infiniment raide ($l_p = \infty$) avec le cas réel ($l_p = 50$ nm) (Bouchiat *et coll.* 1999). Ceci nous permettra donc de tester l'influence du caractère non rectiligne des bras libres sur notre système d'analyse. La Figure 89 montre la comparaison des cartes $L_c/\Delta L$ correspondant à ces deux conditions de longueur de persistance pour une ouverture variable $\langle \theta \rangle = \pi/2$, $\sigma_\theta = \pi/2$ et des bras tels que $l_1 = 30$ nm = 88 pb, $l_2 = 50$ nm = 147 pb d'où $\Delta L = 29$ pb et $L_c = 147$ pb. On remarque que l'état α reste toujours beaucoup plus localisé que sur les cartes expérimentales (comparer Figure 89c et Figure 89f) et que l'effet induit par une longueur de persistance finie est négligeable (Figure 89b et Figure 89c). En outre, on remarque sur les images de la Figure 88 que le choix d'une longueur de persistance de 50 nm (Figure 88c) correspond visuellement à ce que nous observons sur les images expérimentales (Figure 88f, par exemple).

3.1.2.3 Effet de la corrélation $\theta/l_{1,2}$

Pour nous rapprocher encore de la situation réelle, nous avons ensuite couplé ouverture et déroulement du nucléosome. Pour se faire nous tirons comme précédemment selon une distribution normale l'angle du nucléosome et calculons en conséquence la longueur de chacun des bras selon ($l_{1,2} \propto (42/\pi) \times \theta$, voir section 3.1.2.1). La carte de la Figure 89d décrit le résultat d'une telle simulation. On remarque que l'état (α) s'élargit selon la direction L_c mais pas selon la direction ΔL . En effet, par construction l'ouverture des bras est symétrique pour les nucléosomes dans cette simulation, ce qui induit donc un changement de longueur complexée mais, par définition de la mesure de la position ($\Delta L \propto L_+ - L_-$), pas de modification de la position de la dyade qui reste $\Delta L = 29$ pb. Néanmoins, ce cas idéal de parfaite corrélation entre les deux bras paraît difficilement représenter la situation réelle où les fluctuations thermiques agissent de manière indépendante sur chacun des deux bras.

3.1.2.4 Corrélation $\theta/l_{1,2}$ et désynchronisation des deux bras.

Enfin, nous avons enfin construit des nucléosomes virtuels dans lequel chacun des bras est susceptible de fluctuer de manière indépendante ce qui donne lieu à un rallongement/raccourcissement du bras correspondant. En réalisant une telle simulation, nous obtenons une carte $L_c/\Delta L$ très proche de celle obtenue avec les données expérimentales comme le montrent les Figure 89e et f, que ce soit le diamètre de l'état (α) (dans les deux directions L_c et ΔL) ou l'abondance relative des états (α -faux-un-bras). On peut noter la position ΔL de l'état (α) différente et la séparation plus importante entre les états (α) et (α -faux-un-bras) sur les cartes synthétiques du fait de la construction utilisée. Le fait que ces nucléosomes (α -faux-un-bras) soient présents sur les images et les cartes synthétiques suggèrent donc que cet état, visualisé dans les expériences, est simplement la conséquence des fluctuations des bras du nucléosome et de l'imagerie à 2D. Par conséquent, ce n'est pas un état distinct de l'état (α) et nous avons choisis de ne pas représenter cet état minoritaire dans l'étude des mono-nucléosomes à l'équilibre. Néanmoins, nous verrons dans le chapitre 5 que cet état (faux-un-bras) peut devenir prépondérant dans le cas de nucléosomes sur-complexés (voir section 5.1.2)

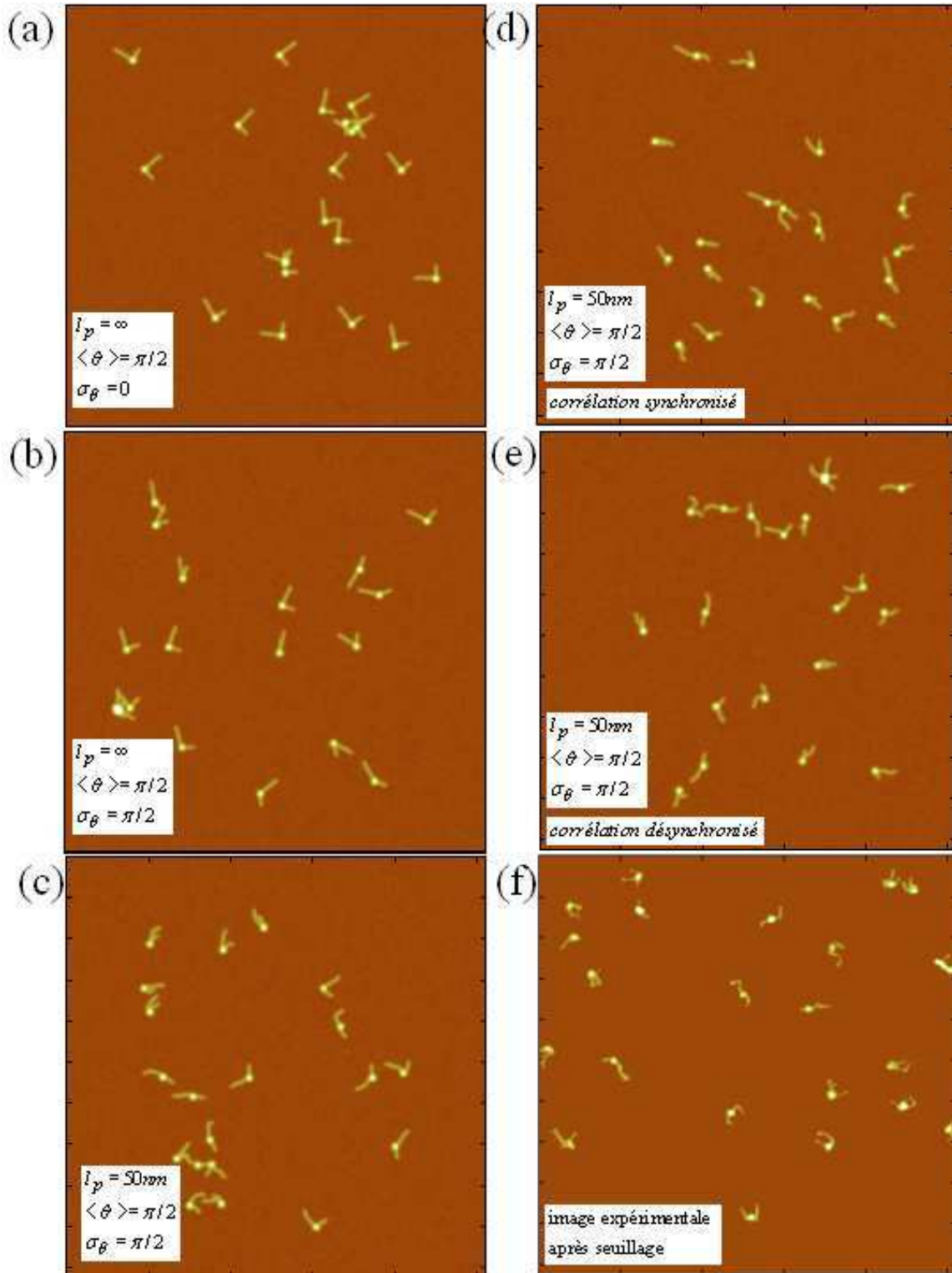


Figure 88 : Images synthétiques de nucléosomes

Images de topographie AFM ($1 \times 1 \mu m$) de mono-nucléosomes synthétiques avec une longueur des deux bras $l_1 = 30 \text{ nm}$ et $l_2 = 50 \text{ nm}$, un angle d'ouverture $\langle \theta \rangle = \pi/2$ et (a) une longueur de persistance de l'ADN $l_p = \infty$ et une flexibilité d'ouverture $\sigma_\theta = 0$; (b) $l_p = \infty$ et $\sigma_\theta = \pi/2$ (le changement d'angle θ ne modifie pas la longueur des bras) ; (c) une longueur de persistance $l_p = 50 \text{ nm}$ et $\sigma_\theta = \pi/2$; (d) $l_p = 50 \text{ nm}$, $\sigma_\theta = \pi/2$ et le changement de l'angle d'ouverture modifie linéairement la longueur des bras de manière synchronisée pour chacun d'eux ; (e) $l_p = 50 \text{ nm}$, $\sigma_\theta = \pi/2$, le déroulement est maintenant désynchronisé entre les deux bras. (f) Image expérimentale obtenue pour les mono-nucléosomes courts.

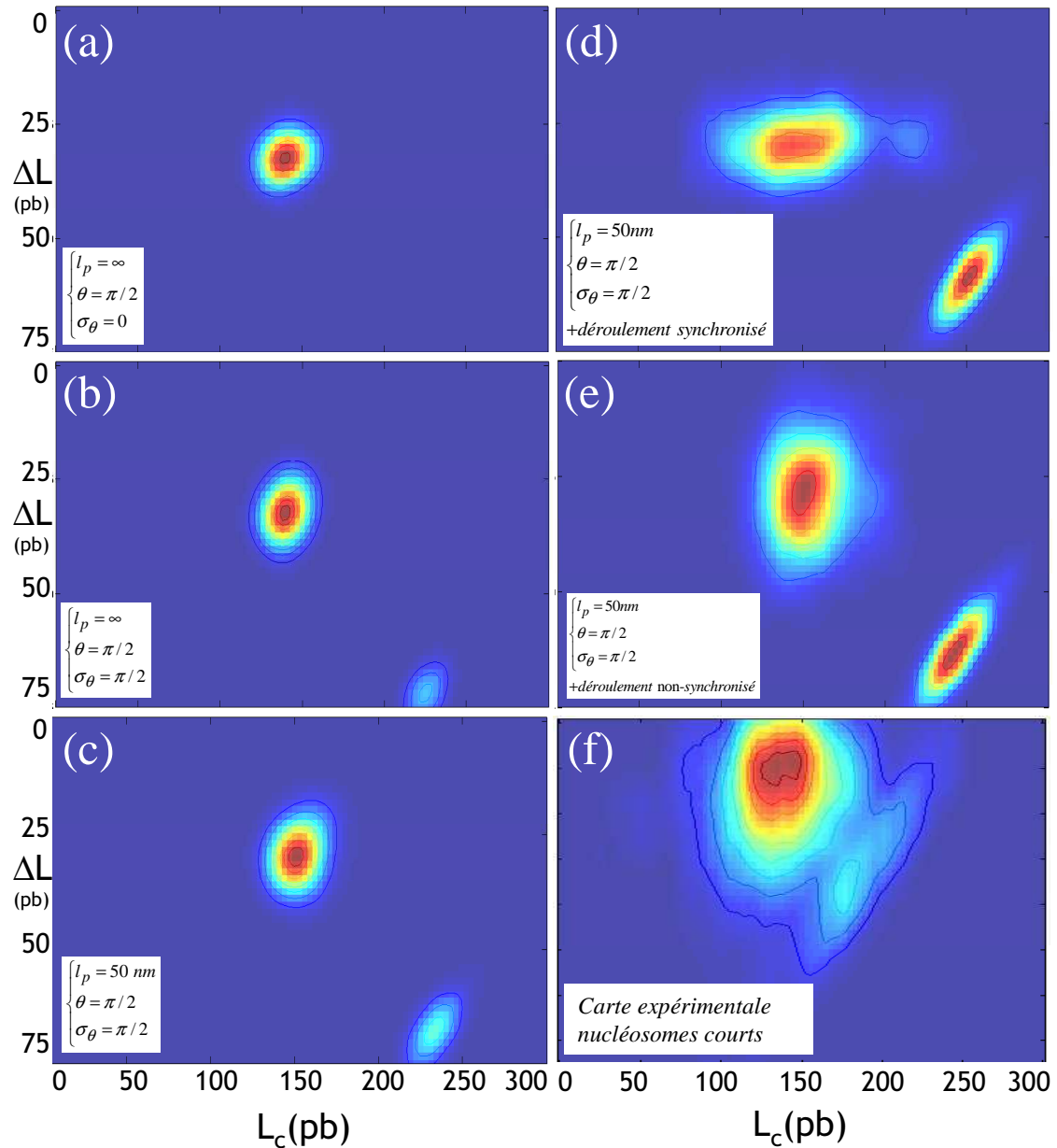


Figure 89 : Cartes $L_c/\Delta L$ simulées montrant l'effet de différents paramètres

Cartes $L_c/\Delta L$ issues de l'analyse de mono-nucléosomes synthétiques avec une longueur des deux bras $l_1 = 30$ nm et $l_2 = 50$ nm, un angle d'ouverture $\langle \theta \rangle = \pi/2$ et (a) une longueur de persistance de l'ADN $l_p = \infty$ et une flexibilité d'ouverture $\sigma_\theta = 0$; (b) $l_p = \infty$ et $\sigma_\theta = \pi/2$ (le changement d'angle θ ne modifie pas la longueur des bras) ; (c) une longueur de persistance $l_p = 50$ nm et $\sigma_\theta = \pi/2$; (d) $l_p = 50$ nm, $\sigma_\theta = \pi/2$ et le changement de l'angle d'ouverture modifie linéairement la longueur des bras de manière synchronisée pour chacun d'eux ; on remarque dans ce cas un élargissement de la distribution 2D selon L_c . (e) $l_p = 50$ nm, $\sigma_\theta = \pi/2$ et le déroulement est maintenant désynchronisé entre les deux bras. On remarque un élargissement de la distribution 2D selon L_c et ΔL ; (f) Carte $L_c/\Delta L$ expérimentale obtenue pour les mono-nucléosomes courts en tenant compte des nucléosomes 'faux-un-bras' (qui ont été rejetés de l'analyse dans la carte $L_c/\Delta L$ de la Figure 85). Pour chacune des cartes, $N > 1200$ nucléosomes ont été analysés.

En résumé, nous avons pu rendre compte de la largeur de l'état (α) dans les directions L_c et ΔL , calculé à partir des données expérimentales en produisant des nucléosomes synthétiques constitués d'une demi-sphère de rayon 5.5 nm et deux bras, de 1 nm de rayon et 50 nm de longueur de persistance, capables de fluctuer indépendamment par rapport à la demi-sphère avec une

amplitude correspondante à celle issue de l'expérience. Dans le cas où les fluctuations sont corrélées ou plus faibles, on obtient un état (α) plus compact.

Nous en concluons que l'étalement de cet état dans les deux directions est bien imposé par la dynamique interne du nucléosome et non par la résolution de notre méthode d'analyse. Pour aller plus loin dans la compréhension de cette dynamique nous avons étudié expérimentalement des facteurs susceptibles de modifier la structure et la dynamique des mono-nucléosomes, proposé un modèle expliquant quantitativement la distribution de longueur complexée et extrait les paramètres énergétiques de la « respiration » du nucléosome.

3.2 Energétique du nucléosome : modèle linéaire

Ce modèle a été élaboré en collaboration avec Martin Castelnovo au Laboratoire.

3.2.1 Présentation du modèle

Différentes approches expérimentales ont été utilisées jusqu'à présent pour étudier la structure et la dynamique du nucléosome, y compris par des études cristallographiques (Luger *et coll.* 1997), des mesures d'accessibilité d'enzymes de restriction (Polach *et coll.* 1995; Wu *et coll.* 2004) et des mesures de FRET (Tomschik *et coll.* 2005; Tomschik *et coll.* 2008). En parallèle, des modèles physiques (Schiessel 2003) et de récents efforts de calcul *ab initio* ont été mis au point pour décrire le nucléosome dynamique et son énergétique (Bishop 2004; Ruscio *et coll.* 2006; Sharma *et coll.* 2007). Nous avons tenté dans ce qui suit, de faire le lien entre ces travaux et nos résultats obtenus par AFM.

La structure cristallographique du nucléosome montre qu'il existe 14 contacts discrets entre l'ADN et l'octamère d'histones responsables pour la stabilité du nucléosome (Richmond *et coll.* 2003). A chacun de ces 14 sites le gain énergétique est le résultat d'interactions électrostatiques et de liaisons hydrogène. A l'échelle de notre analyse AFM, le caractère discret des sites de liaison n'est pas pertinent et nous considérerons une énergie d'adsorption effective $\varepsilon_{a<}$ par unité de longueur (en kT / pb). Le nombre fini de sites de liaison ou, de la même façon, la longueur finie d'ADN complexé sur ces sites (146 pb pour les nucléosomes conventionnels) sont liés à la position spécifique de sites interactions favorables localisés sur la surface de l'octamère d'histones et formant une trajectoire hélicoïdale pour l'ADN. Mais l'enroulement de l'ADN autour du cœur d'histones a un coût énergétique lié à la nécessité de courber fortement l'ADN, donné par :

$\varepsilon_b = \frac{kT \times L_p}{2R^2}$, où L_p est la longueur de persistance de l'ADN et R le rayon de l'octamère d'histones.

La stabilité du nucléosome nécessite que l'énergie nette par unité de longueur soit négative (pour un gain énergétique) et donc que l'on ait $\varepsilon_b < \varepsilon_{a<}$. Les distributions expérimentales de longueurs d'ADN complexé aux histones montrent que de l'ADN supplémentaire peut être enroulé autour de l'octamère. Pour ces paires de base supplémentaires, l'énergie nette par unité de longueur est positive (situation énergétique défavorable, essentiellement à cause de l'énergie de courbure défavorable qui n'est plus compensée par un site d'adsorption spécifique sur l'octamère d'histones). Cependant, pour prendre en compte la possibilité d'une énergie résiduelle attractive non spécifique (essentiellement électrostatique) au-delà des 14 sites d'adsorption, le gain énergétique pour l'ADN qui contacte la surface de l'octamère au-delà du chemin super-hélicoïdal a une valeur différente notée $\varepsilon_{a>}$. La différence $\varepsilon_{a<} - \varepsilon_{a>}$ représente alors la part spécifique des 14 sites d'adsorption (par rapport au reste de la surface de l'octamère) (Figure 90).

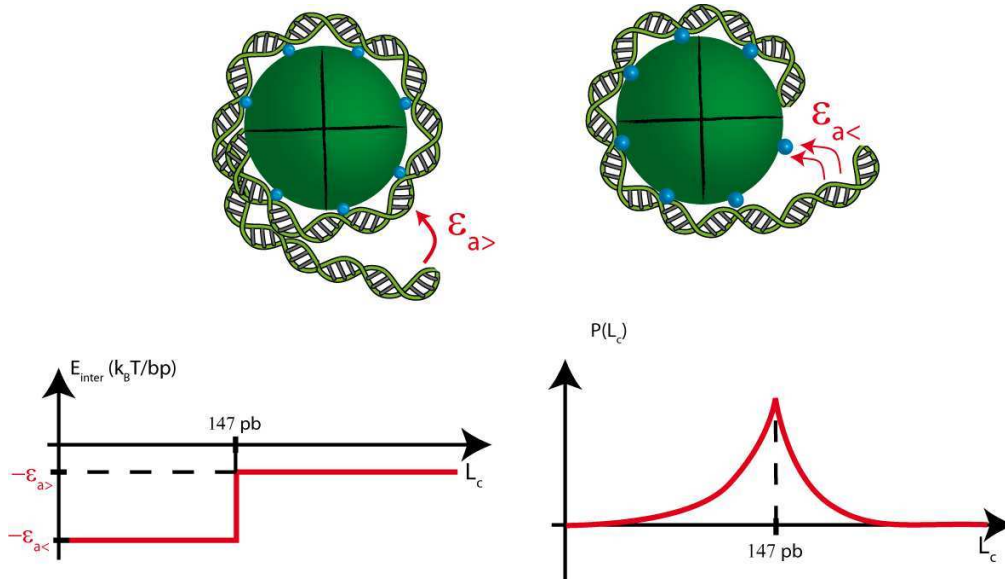


Figure 90 : Modélisation linéaire du mono-nucléosome

Schéma de (en haut à gauche) l'interaction ADN-histones pour une longueur d'ADN complexé $L_c < 147$ pb et (en haut à droite) une longueur $L_c > 147$ pb. (en bas à gauche) Energie d'interaction en fonction de la longueur complexée. ϵ_a correspond au gain énergétique par paire de base pour l'ADN d'être en contact avec la surface de l'octamère d'histones pour un nucléosome sous-complexé ($\epsilon_{a<}$) ou sur-complexé ($\epsilon_{a>}$). (en bas à droite) Distribution de longueur d'ADN complexé correspondant à ce modèle linéaire.

Nous prenons comme référence d'énergie l'ADN libre et droit d'un côté et l'octamère d'histones de l'autre, l'énergie totale du nucléosome peut alors s'écrire :

$$\frac{E(L_c)}{kT} = \begin{cases} (\epsilon_b - \epsilon_{a<}) \cdot L_c & \text{si } L_c < L_c^* \text{ (nucléosome sous-complexé)} \\ (\epsilon_b - \epsilon_{a<}) \cdot L^* + (\epsilon_b - \epsilon_{a>}) \cdot (L_c - L_c^*) & \text{si } L_c > L_c^* \text{ (nucléosome sur-complexé)} \end{cases}$$

La distribution de longueur d'ADN complexé est donnée par $P(L_c) \propto e^{-E(L_c)/(kT)}$. La probabilité est maximum pour la longueur L_c^* , qui caractérise la région de contacts spécifiques histones-ADN. Cette longueur peut être différente pour les nucléosomes conventionnels et les nucléosomes variants. L'hypothèse d'une énergie linéaire avec la longueur d'ADN enroulé et de l'existence de L_c^* conduit à une distribution de probabilité doublement exponentielle. Par construction, on a les contraintes suivantes sur la valeur des énergies définies plus haut : $\epsilon_{a>} < \epsilon_b < \epsilon_{a<}$. Notons que les valeurs des énergies que nous allons déduire de l'analyse de nos distributions expérimentales sont représentatives de mono-nucléosomes adsorbés sur une surface plane chargée et peuvent donc à priori différer des celles correspondant à des nucléosomes en solution.

La distribution de longueur d'ADN complexé doit pouvoir être décrite par un modèle simple de double exponentielle, donc la fonction de densité de probabilité s'écrit comme une distribution de Laplace asymétrique :

$$P(L_c = L) = \frac{1}{2\sqrt{2}\sigma} \begin{cases} e^{-\frac{L-L_c^*}{\sqrt{2}(1-\epsilon)\sigma}}, & \text{for } L > L_c^* \\ e^{+\frac{L-L_c^*}{\sqrt{2}(1+\epsilon)\sigma}}, & \text{for } L < L_c^* \end{cases}$$

où L_c^* est la valeur la plus probable de la distribution, ϵ la relative asymétrie de la distribution de Laplace asymétrique (différence entre les deux pentes des exponentielles) et σ la longueur caractéristique de décroissance de l'exponentielle (moyenne des pentes des deux exponentielles).

3.2.2 Extraction des paramètres et interprétation

Plutôt que d'ajuster les distributions expérimentales avec un fit à plusieurs paramètres, nous avons préféré utiliser une procédure globale plus fiable qui consiste à calculer les 3 premiers moments (μ_1 , μ_2 et $\tilde{\mu}_3$) de la distribution expérimentale :

$$\begin{cases} \mu_1 = \overline{L_c} = L^* - 2\sqrt{2}\varepsilon\sigma \\ \mu_2 = \overline{(L_c - \overline{L_c})^2} = 4\sigma^2(1 + \varepsilon^2) \\ \tilde{\mu}_3 = \frac{\overline{(L_c - \overline{L_c})^3}}{\mu_2^{3/2}} = \frac{-\sqrt{2}\varepsilon}{(1 + \varepsilon^2)^{1/2}} \end{cases}$$

puis d'en extraire ensuite les paramètres d'intérêt que sont : L_c^* , ε et σ en résolvant cette équation. Ces 3 paramètres sont donc obtenus sans fit, simplement en calculant les 3 premiers moments de la série statistique de longueur d'ADN complexée. Finalement, les énergies effectives paramètres, du modèle physique simple que nous avons décrit plus haut, s'expriment comme :

$$\begin{cases} \varepsilon_b - \varepsilon_{a<} = -\frac{1}{\sqrt{2}(1 + \varepsilon)\sigma} = -\frac{1}{L_{<}} \\ \varepsilon_b - \varepsilon_{a>} = \frac{1}{\sqrt{2}(1 - \varepsilon)\sigma} = \frac{1}{L_{>}} \end{cases}$$

ce qui donne enfin : $E_{ads}^{(specific)} = \varepsilon_{a>} - \varepsilon_{a<} = \frac{\sqrt{2}}{(1 - \varepsilon^2)\sigma}$.

Pour vérifier l'adéquation de ce modèle avec les distributions expérimentales, nous traçons la fonction $P(L_c = L)$ pour les valeurs des paramètres L_c^* , ε et σ extraits des données expérimentales et avec la même boîte glissante de 20 pb que pour les distributions expérimentales (Figure 91).

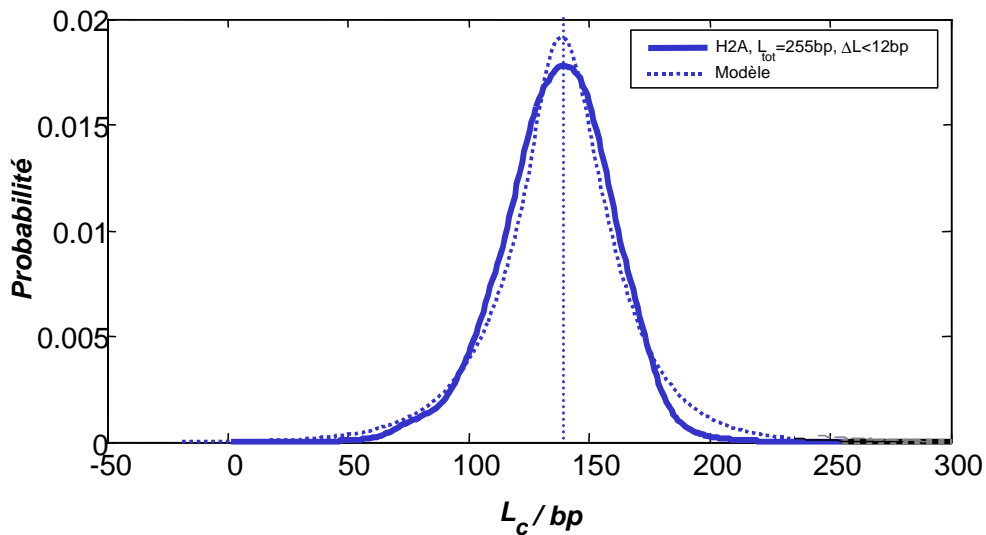


Figure 91 : Modélisation de la longueur d'ADN complexé du mono-nucléosome à l'équilibre

Comparaison de la distribution de longueur complexée L_c expérimentale (trait plein) pour des nucléosomes courts tels que $0 \leq \Delta L \leq 12$ pb et ajustement par le modèle énergétique linéaire (trait pointillé) avec les valeurs des 3 paramètres L_c^* , ε et σ extraits du calcul des moments de la distribution expérimentale.

Les résultats sont reportés dans le Tableau 1 (les énergies sont exprimées en kT/site de liaison en supposant 14 sites de liaison le long des 147 pb d'ADN complexé pour les nucléosomes conventionnels) et suggèrent plusieurs remarques importantes :

- Tout d'abord, les longueurs typiques de décroissance correspondant à des longueurs d'ADN sous- ($L_{<}$) et sur- ($L_{>}$) complexées (Tableau 1b et d) sont clairement supérieures à la résolution intrinsèque de l'AFM (reliée à la taille de la pointe et estimée à ~ 10 pb¹) à la fois pour les nucléosomes conventionnels et variants, ce qui montre que les paramètres extraits sont significatifs. En effet, nous sommes capables de quantifier les énergies d'ADN sous- et sur-complexé pour un mono-nucléosome. Pour l'ADN sur-complexé, les énergies sont exprimées en kT/site de liaison par soucis de comparaison bien que le modèle suppose qu'il n'existe pas de tels sites de liaison ADN/ histones au-delà des 14 sites présents dans la structure cristallographique du nucléosome.
- D'autre part, si l'on suppose que la longueur d'ADN sur-complexé est uniquement due à la courbure de l'ADN autour du cœur d'histones ($\epsilon_{a>} = 0$), alors la valeur trouvée pour ϵ_b conduit à une longueur de persistance $L_p \sim 3.5$ pb, une valeur trop faible pour l'ADN double brin. De plus, l'énergie correspondant à l'ADN sur-complexé ($\epsilon_b - \epsilon_{a>}$) est de la même amplitude que celle de l'ADN sous-complexé ($\epsilon_b - \epsilon_{a<}$) mais de signe opposé (Tableau 1c et e) ce qui signifie que cette énergie sur-complexée ne peut pas être simplement due à une pénalité d'énergie de courbure, ce qui justifie à posteriori notre hypothèse d'une énergie résiduelle attractive entre l'ADN et l'octamère d'histones au-delà des 147 pb enroulés.
- Enfin, nous pouvons estimer la spécificité des 14 sites d'adsorption à l'intérieur du nucléosome ($\epsilon_{a<} - \epsilon_{a>}$) (Tableau 1f). Cette énergie spécifique (Tableau 1f) peut être interprétée comme une approximation de la contribution non-électrostatique de l'énergie d'adhésion entre l'ADN et l'octamère d'histones.

	(a) $\langle L_c \rangle$ (bp)	(b) $L_{<}$ (bp)	(c) $\epsilon_b - \epsilon_{a<}$ (kT per site)	(d) $L_{>}$ (bp)	(e) $\epsilon_b - \epsilon_{a>}$ (kT per site)	(f) $\epsilon_{a<} - \epsilon_{a>}$ (kT per site)
nucléosome conventionnel	146 ± 2	22 ± 1.6	-0.479 ± 0.045	17 ± 1.4	0.61 ± 0.064	1.1 ± 0.072
'Site exposure model' (g)			$-3 < \dots < -0.5$			
Structure du NCP (h)	147					$0.8 < \dots < 2$

Tableau 1 : Résumé des paramètres extraits pour les mono-nucléosomes

(a) Longueur complexée moyenne. (b) Longueur caractéristique de décroissance pour les configurations sous-complexées. (c) Energie nette d'adsorption par site ($1/L_{<}$) pour les configurations sous-complexées. (d) Longueur caractéristique de décroissance pour les configurations sur-complexées. (e) Energie nette d'adsorption par site ($1/L_{>}$) pour les configurations sur-complexées. (f) Asymétrie d'énergie d'adhésion par site entre les configurations sous- et sur-complexées. (g) Données extraites à partir de l'étude de Polach et Widom (Polach *et coll.* 1995) utilisant le '*site exposure model*'. (h) Données extraites à partir de l'étude de Richmond et Davey (Richmond *et coll.* 2003) sur la structure du NCP. Les valeurs des incertitudes ont été calculées en utilisant le théorème de la limite centrale et un calcul de propagation d'erreur. Nombre de nucléosomes analysés $N = 301$ nucléosomes.

¹ La résolution de 10 pb est estimée par analyse d'image du même fragment d'ADN nu sur la même surface et dans les mêmes conditions expérimentales

Les valeurs extraites (Tableau 1) peuvent être comparées à d'autres estimations reportées dans la littérature. Le gain énergétique net par site peut être comparé à des valeurs issues des expériences de Widom *et coll.* (Polach *et coll.* 1995; Polach *et coll.* 1996; Anderson *et coll.* 2000). Ces expériences visaient à sonder l'exposition transitoire de l'ADN complexé dans un nucléosome en utilisant différentes enzymes de restriction agissant à des sites bien précis le long de l'ADN. Les résultats expérimentaux montrent clairement que l'accessibilité de l'ADN est fortement réduite lorsque les sites de restriction sont situés loin de l'entrée ou la sortie de l'ADN nucléosomal en direction de la dyade. A partir des données expérimentales, les auteurs extraient un poids de Boltzmann pour les différents sites exposés. Cette distribution devrait être à priori similaire à notre distribution de longueur d'ADN complexé, sauf que seuls les nucléosomes sous-complexés sont sondés. Cependant, l'utilisation de plusieurs enzymes de restriction ayant des tailles différentes et des mécanismes d'action différents conduit à une incertitude inhérente pour l'estimation des énergies libres de la distribution de Boltzmann. En d'autres termes, seule une gamme d'énergie par site de liaison peut être extraite de ces expériences d'accessibilité. A la différence des principaux travaux précédents qui utilisent ces expériences de Polach et Widom et citent une valeur unique de 2 kT par site de liaison (Schiessel 2003). Le gain énergétique net que nous pouvons extraire de ces données de biochimie est dans la gamme 0.5 à 3 kT par site.

Les valeurs extraites de nos expériences d'AFM coïncident donc avec la borne inférieure de cette gamme de valeurs. Ceci peut être dû à la différence entre les deux types d'expériences effectuées. En effet, nos observations sont réalisées sur des nucléosomes adsorbés sur une surface chargée. Ceci peut modifier l'énergétique d'ouverture du nucléosome par rapport à sa valeur en solution. Une autre différence entre les expériences de Widom *et coll.* et nos mesures AFM se trouve dans la composition du tampon utilisé, qui peut modifier la stabilité du nucléosome (Claudet *et coll.* 2005). En particulier, le tampon utilisé pour les expériences d'enzymes de restriction contient plus d'ions magnésium (~10 mM $MgCl_2$) qui ont tendance à fermer le nucléosome.

La spécificité des sites de liaison de l'ADN sur l'octamère d'histones (Tableau 1, f) peut aussi être comparée aux valeurs issues des expériences de rayons X effectuées par Richmond et Davey (Richmond *et coll.* 2003). En effet, en comptant les liaisons hydrogène par site de liaison qui se trouvent dans cette structure cristallographique du nucléosome, on peut estimer la contribution spécifique de l'énergie de liaison ADN-histones dans un intervalle 0.8 à 2kT / site (Nikova *et coll.* 2004). Notre estimation pour les nucléosomes conventionnels (1.1 kT/site) se trouve dans cet intervalle.

En conclusion nous voyons que cette approche délibérément simplifiée de la dynamique du nucléosome nous permet de faire le lien entre les résultats obtenus lors de nos expériences AFM et les données de la littérature sur la dynamique du nucléosome. Nous avons pu remarquer que les valeurs mesurées à l'aide de ce modèle leur sont comparables aux modèles couramment présentées. Ceci conforte donc notre approche visant à observer des modifications dynamiques et structurales du nucléosome sous l'effet, par exemple, de l'incorporation de variants d'histones au sein l'octamère d'histones. Avant d'étudier cet aspect, nous allons nous intéresser à quelques facteurs susceptibles de modifier la structure et la dynamique à l'équilibre du mono-nucléosome, tels que la présence de l'histone de liaison H1 ou du tétramère (H3-H4)₂ seul au sein du nucléosome.

3.3 Quelques facteurs à l'équilibre modifiant la carte $L/\Delta L$: histone de liaison, tétrasome

3.3.1 Tétrosomes (H3-H4)₂

Il est possible de reconstituer des particules nucléosomales à partir des seules histones H3 et H4. Les objets ainsi formés par le même procédé de dialyse sont nommés tétrasomes. Ces particules sont connues pour être positionnées par les séquences du type 601, sont moins stables et sont plus accessibles aux nucléases que les nucléosomes canoniques (Dong *et coll.* 1991). Nous avons étudié quelle est l'influence de cette modification de composition sur nos cartes 2D $L_c/\Delta L$. En particulier nous avons cherché à savoir si le tétrasome comporte un seul tour d'ADN autour de son cœur protéique (~ 85 pb) et s'il est positionné efficacement par la séquence 601.

En suivant le même type de protocole de reconstitution que précédemment (voir section 3.1.1) nous avons reconstitué des tétrasomes sur le fragment d'ADN court de 255 pb comportant une séquence positionnante 601 placée à 52 pb d'un bord et 56 pb de l'autre bord.

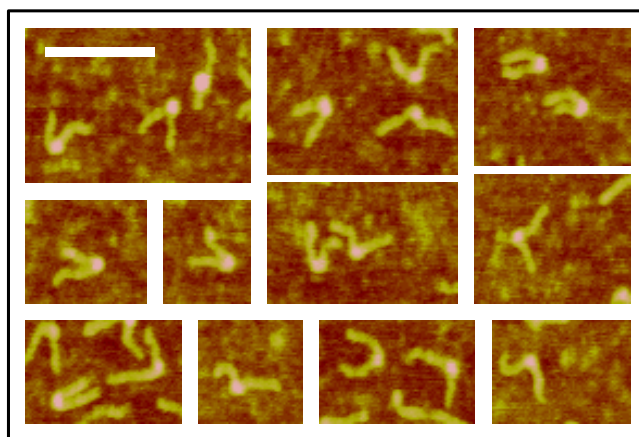


Figure 92 : Mono-tétrosomes purifiés

Images AFM de topographie de mono-tétrosomes purifiés sur gel acrylamide. Barre d'échelle X/Y : 100 nm. Echelle Z : de 0 (marron foncé) à 1 ou 1.5 nm (blanc rosé). On remarque la hauteur de la partie protéique plus faible que pour les nucleosomes et la forme caractéristique en 'V' des bras d'ADN.

Nous avons tout d'abord obtenu la carte $L_c/\Delta L$ de la Figure 93a. Comme on le voit, il apparaît majoritairement deux configurations positionnées dans la séquence 601 : l'une comporte 80 pb d'ADN associé au cœur protéique, l'autre 130 pb. Pour les caractériser nous les avons fait migrer le contenu de la reconstitution sur gel acrylamide. Il apparaît alors deux bandes distinctes montrant que notre reconstitution est un mélange de deux espèces. A quoi correspondent donc ces deux configurations? Des études précédentes de (Camerini-Otero *et coll.* 1978; Klevan *et coll.* 1978; Thomas *et coll.* 1979; Dong *et coll.* 1991) ont montré que lorsque l'on reconstitue par dialyse des tétrasomes sur une séquence positionnante de 147pb on est susceptible de former également des di-tétrosomes c'est-à-dire deux tétrasomes placés immédiatement l'un à la suite de l'autre sur la séquence d'ADN positionnante.

En collaboration avec Manu Shukla qui a mis au point le protocole de purification sur gel, nous pouvons découper chaque bande du gel, éluer son contenu et déposer l'éluat sur des surfaces AP-mica. En utilisant notre approche AFM, nous pouvons alors visualiser les états des nucléosomes ainsi purifiés de chaque bande et effectuer une analyse $L_c/\Delta L$. En utilisant cette approche, nous avons refait l'analyse $L_c/\Delta L$ pour l'une des deux fractions seulement. Si l'on considère la fraction qui migre le plus lentement et qui, donc, comporte la plus grande longueur d'ADN non complexé, on obtient une carte $L_c/\Delta L$ différente où seule la configuration comportant 80 pb apparaît (Figure 93b). Les di-tétrosomes migrent de manière plus rapide que les tétrasomes car leur ADN de liaison est plus court et comporte le double de la quantité d'histones pour un ADN. Ainsi on comprend alors pourquoi la deuxième configuration de la carte $L_c/\Delta L$ de la Figure 93a possèdent 130 pb

d'ADN complexée (2 tétrasomes), et pourquoi les deux configurations sont positionnées correctement par la séquence 601 (même position sur la carte (Figure 93a).

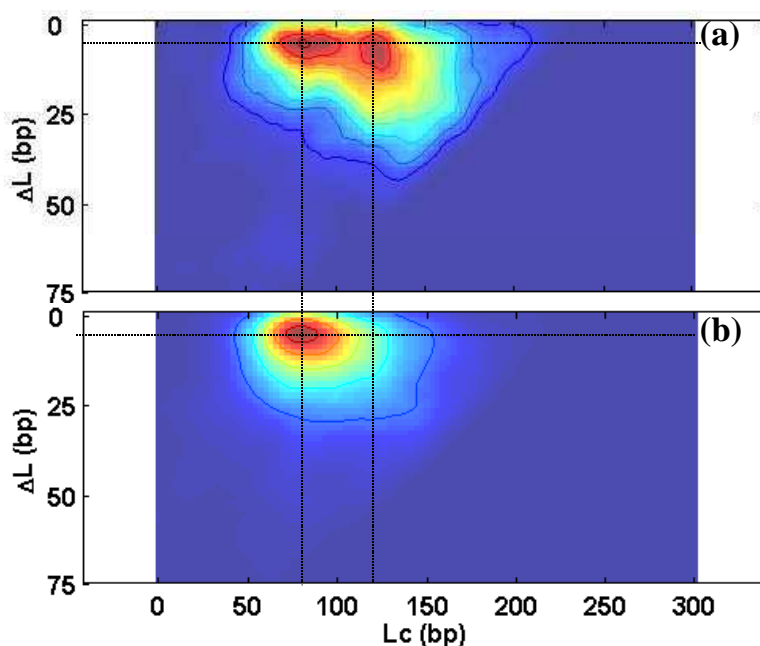


Figure 93 : Carte $L_c/\Delta L$ de tétrasomes

Carte $L_c/\Delta L$ de tétrasomes (a) avant purification ($N = 2414$ complexes) où l'on remarque deux états distincts positionnés dans la séquence 601 ($L_c \sim 80$ pb et $L_c \sim 130$ pb) ; et (b) après purification des espèces migrant lentement sur gel acrylamide ($N = 9600$ mono-tétrasomes). Dans ce cas, on conserve uniquement l'état correspondant à $L_c \sim 80$ pb.

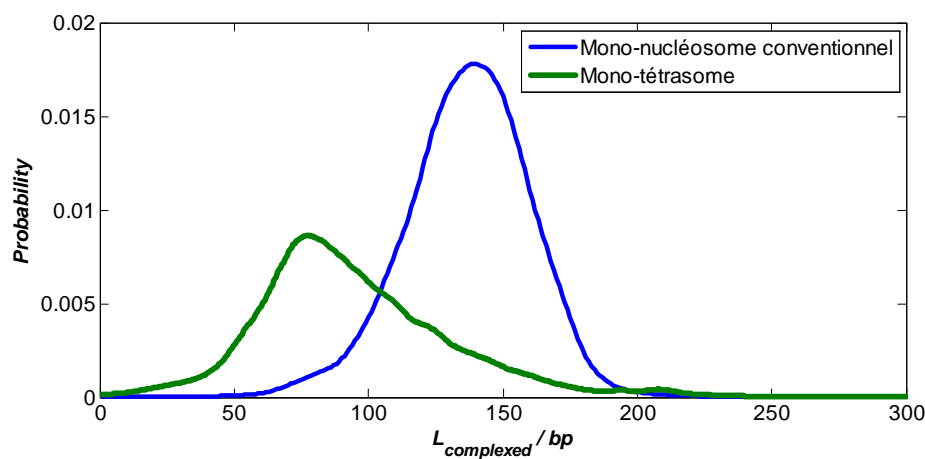


Figure 94 : Distribution de longueur complexée des mono-tétrasomes purifiés.

Comparaison des distributions de L_c pour des mono-nucléosomes conventionnels et des tétrasomes. On remarque que la distribution correspondant aux tétrasomes présente un maximum de probabilité plus bas (79 pb) et une plus grande asymétrie. Seuls les complexes bien positionnés ($\Delta L < 12$ pb) sont pris en compte.

Intéressons nous maintenant uniquement aux mono-tétrasomes purifiés, les images AFM que nous avons obtenues sont présentées sur la Figure 92 et la carte $L_c/\Delta L$ sur la Figure 93b. Il est possible d'étudier comme précédemment la distribution de longueur complexée L_c en projetant la

carte sur cet axe. Comme on le voit sur la Figure 94, la distribution possède un maximum de probabilité à 79 pb proche à la fois de la valeur prédite géométriquement pour une complexation d'un tour d'ADN au autour du tetramère (147 pb pour 1.75 tours soit 84 pb / tour), et des mesures de digestion à la microcoque nucléase (73 pb, Dong *et coll.* 1991). De même cette distribution est plus large et plus asymétrique que la distribution de longueur complexée des nucléosomes conventionnels. Elle présente une pente plus raide pour les configurations moins complexées et une pente plus faible pour les configurations plus complexées.

On peut de la même manière que précédemment ajuster cette distribution à l'aide du modèle énergétique linéaire (voir 3.2.1). Pour ce faire, on extrait les trois premiers moments de la distribution puis on détermine les même paramètres énergétiques que pour les nucléosomes conventionnels (voir 3.2.2). On obtient alors :

$$\begin{cases} \varepsilon_{a<} - \varepsilon_b = 0.691 \text{ kT / site} ; \varepsilon_{a>} - \varepsilon_b = 0.27 \text{ kT / site} ; L^* = 79 \text{ pb} \\ \varepsilon_{net} = 0.691 \text{ kT / site} ; \varepsilon_{spé} = 0.96 \text{ kT / site} \end{cases}$$

Comme on le voit l'énergie spécifique d'adsorption pour un site est la même que pour un octamère d'histone alors que l'énergie nette d'adsorption est plus grande. Si l'on considère que l'énergie de courbure de l'ADN est la même pour les mono-nucléosomes et les mono-tétrosomes, on a

$$\varepsilon_{net} = \varepsilon_b + \varepsilon_{spé} + \varepsilon_{nonspé}$$

d'où

$$\varepsilon_{nonspé}^{tetra} - \varepsilon_{nonspé}^{nuc} = \varepsilon_{net}^{nuc} - \varepsilon_{net}^{tetra} + \varepsilon_{spé}^{tetra} - \varepsilon_{spé}^{nuc} < 0$$

La composante non spécifique est donc plus faible. Ceci correspond au fait que la structure locale d'un contact histone-ADN est la même pour le tétramère ($\varepsilon_{spé}$ identique) mais que la charge résiduelle d'un tétramère est plus faible que celle d'un octamère d'histone ($\varepsilon_{nonspé}$ inférieure pour le tétrasome).

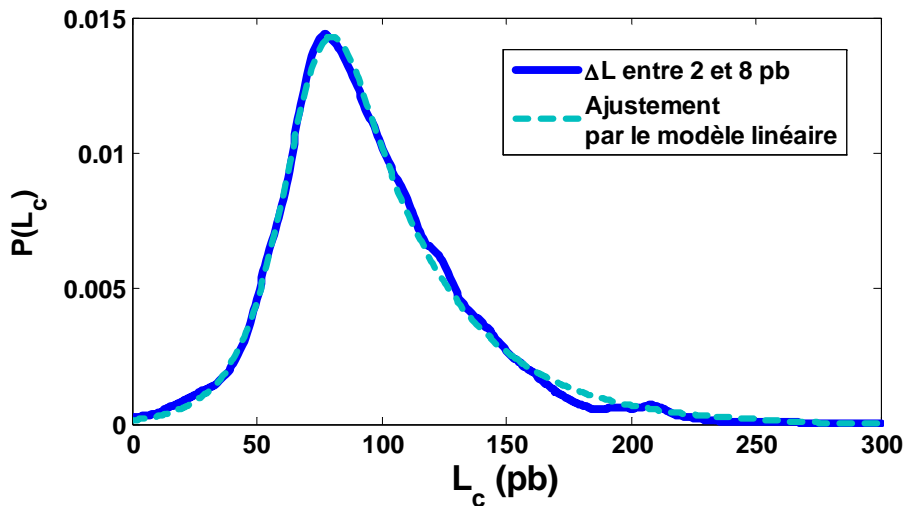


Figure 95 : Modélisation de la distribution de longueur complexée par le modèle linéaire

Le même type de modélisation que celui utilisé pour les mono-nucléosomes courts conventionnels et variants nous permet d'extraire de la distribution de longueur complexée obtenue pour les mono-tétrosomes les paramètres énergétiques correspondants. On obtient là aussi un bon accord entre le modèle et l'expérience. Par rapport au mono-nucléosome conventionnel, on observe que l'énergie nette d'adsorption par site est plus faible alors que l'énergie spécifique reste très proche.

En résumé, nous avons vu que notre méthode nous permet de différencier les mono-tétrosomes des nucléosomes conventionnels à l'aide de deux paramètres principaux : la longueur complexée moyenne et l'énergie nette d'interaction. A l'opposé, l'énergie spécifique d'interaction est la même que pour le nucléosome conventionnel ce qui suggère que le type de liaison histone-ADN est le même.

3.3.2 Effet de l'histone de liaison H1

De la même manière nous nous sommes intéressés à un facteur susceptible de fermer le nucléosome et de réduire sa dynamique. Nous avons fait interagir des mono-nucléosomes longs et asymétriques (nucléosomes 127-601-82, voir Figure 84) avec l'histone de liaison H1 en présence de NAP1 une chaperonne d'histone ayant la capacité d'intégrer H1 au nucléosome (Zlatanova *et coll.* 2007). Après un temps de réaction à 29°C de 30 minutes, nous avons déposé le mélange sur une surface AP-mica. On peut remarquer deux types de nucléosomes (Figure 96): des nucléosomes ressemblant aux nucléosomes conventionnels (60% des objets) et des nucléosomes dont le NCP est plus volumineux et asymétrique avec des bras d'ADN qui sont quasiment parallèles (20-30 % des objets).

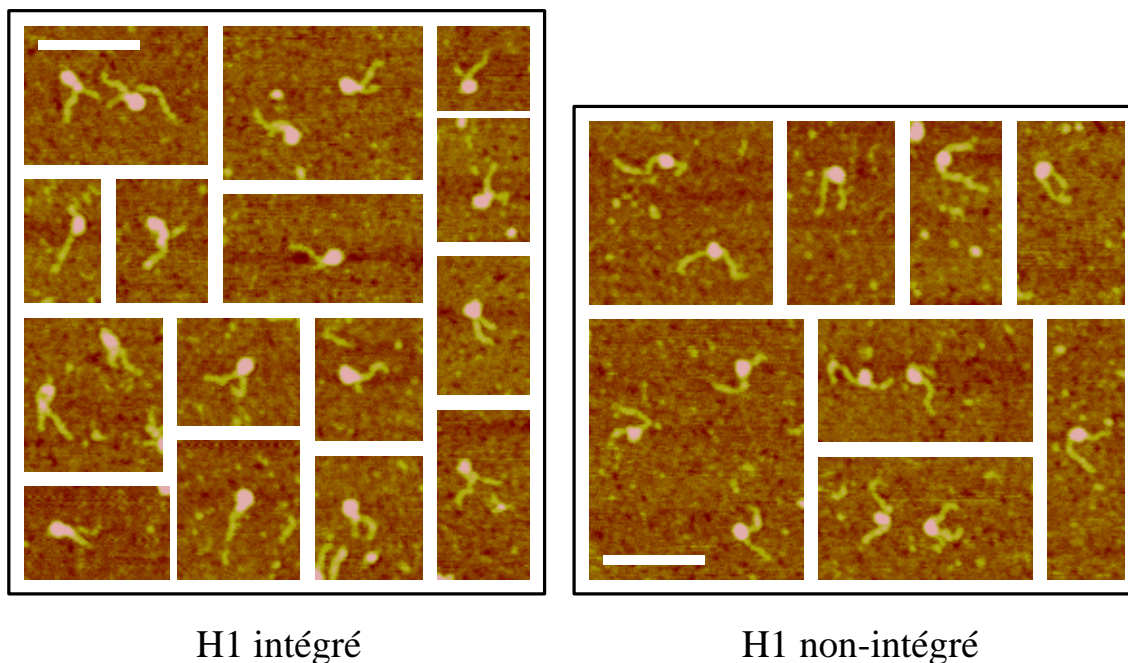


Figure 96 : Mono-nucléosomes conventionnels et histone de liaison

Images AFM de topographie. Barre d'échelle X/Y : 100 nm. Echelle Z : de 0 (marron foncé) à 1.5 nm (blanc rosé). (à gauche) Mono-nucléosomes conventionnels longs et ayant intégrés l'histone de liaison H1. (à droite) Mono-nucléosomes conventionnels longs et n'ayant pas intégrés l'histone de liaison H1.

On peut supposer que ces derniers sont des nucléosomes ayant intégré l'histone de liaison H1 ce qui réduit la dynamique des bras ADN et augmente le volume de la partie protéique du complexe. On peut donc penser qu'on a donc obtenu une intégration partielle de l'histone de liaison qui doit conduire à une augmentation apparente de la longueur complexée. Après l'analyse de ces images on mesure une longueur complexée moyenne de $\langle L_{c,H1} \rangle = 170 \text{ pb} \pm 3 \text{ pb}$ significativement supérieure à longueur complexée mesurée à l'équilibre ($147 \text{ pb} \pm 2 \text{ pb}$). Néanmoins, du fait du faible nombre de nucléosomes analysés et de l'intégration partielle de l'histone de liaison il est difficile d'analyser plus quantitativement ces données.

3.4 Mono-nucléosomes variants H2A.Bbd et chimères

Nous avons montré que notre méthode est capable de mesurer des phénomènes modifiant de manière importante la structure et/ou la dynamique de la particule nucléosomale et en particulier la distribution de longueur complexée. Nous allons maintenant nous intéresser à l'impact plus faible de l'incorporation du variant d'histone H2A.Bbd en remplacement de l'histone H2A sur lequel nous nous focaliserons plus en détail.

3.4.1 Visualisation de mono-nucléosomes H2A.Bbd et obtention de la distribution de longueur complexée

La méthode de reconstitution par dialyse avec des histones purifiés, permet de remplacer un des histones par son variant (ici H2A.Bbd à la place de H2A) et ainsi de reconstituer des nucléosomes variants. Des mono-nucléosomes H2A.Bbd (sur un fragment de 255 pb contenant la séquence 601 positionnante) ont été déposés sur le mica fonctionnalisé AP-mica et visualisés par AFM dans l'air. Les images AFM montrent une population de mono-nucléosomes moins homogène que dans le cas des nucléosomes conventionnels. Le taux de reconstitution est moins bon (plus d'ADN libre : 2 à 3 ADN libres pour un mono-nucléosome).

En suivant la même procédure que pour les nucléosomes conventionnels, nous sélectionnons les nucléosomes bien positionnés ($\Delta L < 12$ pb) et comparons les distributions de longueurs d'ADN complexé pour les deux types de nucléosomes (conventionnels et variants) reconstitués sur le même fragment d'ADN.

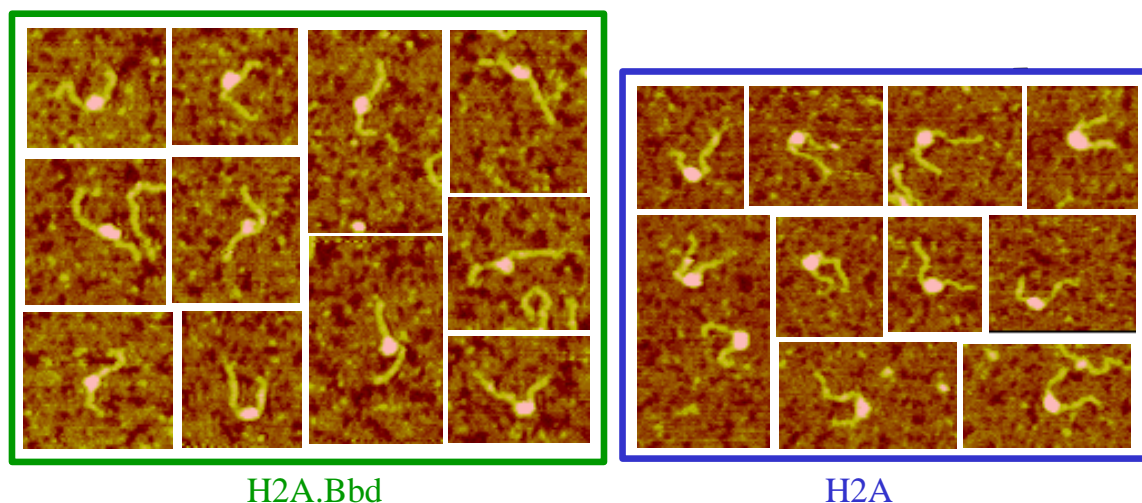


Figure 97 : Mono-nucléosomes variants H2A.Bbd et conventionnels H2A

Images AFM de topographie. Barre d'échelle X/Y : 100 nm. Echelle Z : de 0 (marron foncé) à 1.5 nm (blanc rosé). (à gauche) Mono-nucléosomes longs (356pb) variants H2A.Bbd. (à droite) Mono-nucléosomes longs conventionnels H2A.

Pour les nucléosomes variants H2ABbd, on observe une distribution décalée vers les plus petites longueurs d'ADN complexé et élargie (voir Figure 98). Le maximum de la distribution de longueur d'ADN complexé est clairement différent pour les mono-nucléosomes H2A.Bbd avec une valeur maximum pour la distribution de $L_c^*_{H2A.Bbd} = 130 \pm 3$ pb à comparer à $L_c^*_{H2A} = 146 \pm 2$ pb. Cette différence correspond à environ deux sites d'adsorption de l'ADN sur l'octamère d'histone en moins par rapport au nucléosome conventionnel (1 site/10 pb). De plus, l'écart type de la distribution est presque doublé : $\sigma_{Lc\ H2A.Bbd} = 41$ pb à comparer à $\sigma_{Lc\ H2A} = 23$ pb. La largeur de la

distribution obtenue traduit la dynamique d'ouverture et fermeture des deux bras d'ADN en solution (avant le dépôt) autour du cœur protéique.

Ces différences montrent que le nucléosome variant H2A.Bbd est un complexe plus labile contenant moins d'ADN lié en bon accord avec les observations précédentes en AFM et cryoEM (Doyen *et coll.* 2006). Des expériences de digestion du nucléosome H2A.Bbd par la microcoque nucléase indiquent que l'ADN s'enroulent autour de l'octamère d'histones sur seulement 118 pb (Bao *et coll.* 2004; Doyen *et coll.* 2006) mais la longueur d'ADN complexé ainsi mesuré correspond à une longueur d'ADN protégée par l'octamère vis à vis de la digestion par la microcoque nucléase, celle-ci pouvant digérer au-delà des bornes du nucléosome dont la stabilité est réduite par la présence du dimère H2A.Bbd. En outre, une digestion plus restreinte de ces nucléosomes variants conduit à une longueur complexée de $130\text{pb} \pm 3\text{pb}$ (Doyen *et coll.* 2006). La plus grande accessibilité de l'ADN du nucléosome H2A.Bbd pourrait de façon plus générale faciliter la mise en œuvre des processus nécessitant la liaison de facteurs à l'ADN.

Enfin, la distribution de longueur d'ADN complexée est asymétrique pour les nucléosomes conventionnels. L'asymétrie de la distribution peut être quantifiée en mesurant $\tilde{\mu}_3$, défini par :

$$\tilde{\mu}_3 = \frac{\mu_3}{\mu_2^{3/2}} = \frac{(\overline{L_c} - \overline{L_c})^3}{((\overline{L_c} - \overline{L_c})^2)^{3/2}}$$

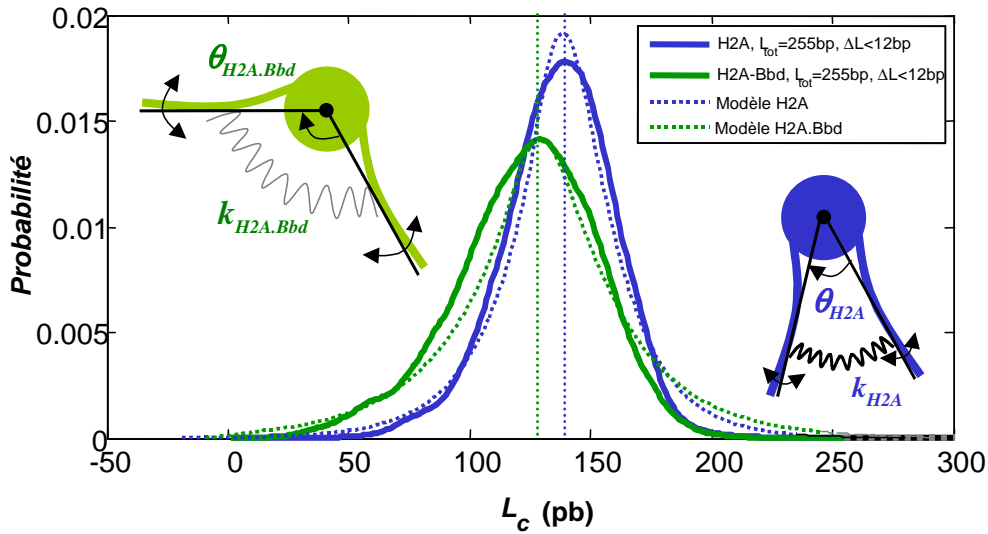


Figure 98 : Distribution de longueur complexée L_c pour des nucléosomes variant H2A.Bbd et conventionnels H2A.

Pour les nucléosomes variants la distribution de longueur complexée est plus large et décalée vers les valeurs plus basses de longueur de complexation L_c . Tout se passe donc comme si le nucléosome H2A.Bbd était un mobile moins rigide (schématisé par un ressort entre les deux bras de raideur $k_{H2A.Bbd} < k_{H2A}$) et plus ouvert (angle $\theta_{H2A.Bbd} > \theta_{H2A}$) que le nucléosome conventionnel H2A.

On trouve $\tilde{\mu}_3 = -0.57 \pm 0.09$ pour le nucléosome conventionnel, le signe moins signifiant que les configurations sous-complexées en ADN (par rapport à la valeur moyenne de 146 pb) sont énergétiquement plus favorable que des configurations sur-complexées. En ce qui concerne les nucléosomes variants H2A.Bbd la distribution est quasi-symétrique ($\tilde{\mu}_3 \sim 0.01 \pm 0.16$). Ces résultats seront interprétés dans le cadre du modèle simple que nous avons présenté dans la section 3.2.1.

3.4.2 Modélisation de la distribution de longueur complexée

La comparaison entre nucléosome conventionnel et nucléosome variant montre qu'à la fois la longueur moyenne complexée et les fluctuations autour de cette valeur sont différentes. En utilisant les mêmes méthodes que pour les nucléosomes conventionnels nous avons donc extrait les paramètres énergétiques des nucléosomes variants H2A.Bbd. Les mesures correspondantes sont rassemblées dans le Tableau 2. La longueur d'ADN complexée moyenne $L_{c \text{ H2A.Bbd}} = 127$ pb signifie soit l'absence soit le relâchement d'au moins deux sites de liaison ADN-histones. De plus, l'énergie, et donc la stabilité du nucléosome pour les sites de liaison restants est réduite ($\epsilon_{\text{H2A.Bbd}} \sim 2/3 \epsilon_{\text{H2A}}$), en accord avec d'autres observations expérimentales (Bao *et coll.* 2004; Gautier *et coll.* 2004; Doyen *et coll.* 2006).

	(a) $\langle L_c \rangle$ (bp)	(b) L_c (bp)	(c) $\epsilon_b - \epsilon_{u<}$ (kT per site)	(d) $L_{>}$ (bp)	(e) $\epsilon_b - \epsilon_{u>}$ (kT per site)	(f) $\epsilon_{u<} - \epsilon_{u>}$ (kT per site)
nucléosome conventionnel	146 ± 2	22 ± 1.6	-0.479 ± 0.045	17 ± 1.4	0.61 ± 0.064	1.1 ± 0.072
nucleosome variant	127 ± 3	31 ± 1.5	-0.33 ± 0.022	27 ± 1.5	0.39 ± 0.026	0.72 ± 0.021

Tableau 2 : Résumé des paramètres extraits de la modélisation pour les nucléosomes conventionnels H2A et variants H2A.Bbd

(a) Longueur complexée moyenne (b) Longueur caractéristique de décroissance pour les configurations sous-complexées. (c) Energie nette d'adsorption par site ($1 / L_c$) pour les configurations sous-complexées. (d) Longueur caractéristique de décroissance pour les configurations sur-complexées. (e) Energie nette d'adsorption par site ($1 / L_{>}$) pour les configurations sur-complexées. (f) Asymétrie d'énergie d'adhésion par site entre les configurations sous- et sur-complexées. $N = 384$ nucleosomes variant H2A.Bbd.

Si l'on comprend les fluctuations d'ouverture/fermeture des nucléosomes comme étant dues au décrochage d'un certain nombre de contacts histone ADN, on voit donc que les nucléosomes H2A.Bbd se comporte comme des mobiles comportant des ressorts angulaires plus ouverts et moins raides que les nucléosomes conventionnels.

3.4.3 Mono-nucléosomes chimères Bbd.ddH2A

Afin de déterminer quels domaines structuraux de l'histone H2A.bbd sont responsables des différences de comportement de structure (valeur moyenne de L_c) et dynamique (largeur de la distribution de L_c , labilité du complexe nucléosomal), un histone chimère a été produite au laboratoire par Cécile Doyen : Bbd.ddH2A (pour histone H2A.Bbd contenant le *docking domain* (et la partie C-ter) de H2A, (Doyen *et coll.* 2006)). La différence majeure entre l'histone conventionnelle H2A et le variant d'histone H2A.Bbd réside dans la partie C-terminale des deux protéines. L'histone H2A.Bbd ne possède pas une partie du '*docking domain*' (ou domaine d'accrochage) impliqué dans l'interaction avec l'histone H3 (c'est à dire responsable du lien entre le dimère H2A/H2B et le tétramère (H3/H4)₂) au sein du nucléosome (voir section 1.2.1.3.4). L'histone chimère Bbd.ddH2A est donc la protéine de fusion obtenue en remplaçant le '*docking*

domain' de l'histone H2A.Bbd (où se concentre l'essentiel des différences entre H2A et H2A.Bbd) par celui de l'histone conventionnel H2A.

La reconstitution de mono-nucléosomes chimériques Bbd-ddH2A, nous a permis d'observer par AFM que la particule ainsi générée retrouve une partie des propriétés structurales et dynamiques du nucléosome conventionnel. En effet, nous avons mesuré une longueur moyenne d'ADN organisé par l'octamère chimère : $L_{c \text{ Bbd.ddH2A}} = 143 \pm 2$ pb, très proche de celle du nucléosome conventionnel (et en bon accord avec les images de cryoEM (Doyen *et coll.* 2006)) et une largeur de distribution $\sigma_{L_{c \text{ Bbd.ddH2A}}} \sim 35$ pb, proche de celle obtenue pour le mono-nucléosome variant H2A.Bbd ($\sigma_{L_{c \text{ H2A.Bbd}}} = 41$ pb). Nous verrons dans le chapitre 4 que les propriétés particulières de cette chimère d'histone nous ont permis de tester le rôle de la flexibilité de l'angle d'ouverture du nucléosome dans la formation de structures d'ordre supérieur de la chromatine comme la fibre compacte de 30 nm.

3.5 Conclusion sur les mono-nucléosomes à l'équilibre

Nous avons, dans cette partie, vu un bref aperçu de ce que peut nous apprendre l'étude AFM de complexes nucléo-protéique à l'équilibre. La grande précision de ces résultats et leur bon accord avec d'autres approches (notamment les mesures biochimiques et l'imagerie par cryo-microscopie électronique de Jan Bednar du Laboratoire de Spectrométrie Physique à Grenoble) permet de valider notre approche expérimentale. De même, le fait que nous sommes capables d'accéder à la fois à des différences de structure et de dynamique subtiles à l'échelle du mono-nucléosome nous a permis de proposer un modèle quantitatif rendant compte de la dynamique des mono-nucléosomes conventionnels et variants.

Pour se rapprocher un peu plus de la chromatine telle que l'on peut l'observer dans le noyau des cellules eucaryotes, nous avons étendu notre étude de l'effet du variant H2A.Bbd sur la conformation des nucléosomes à l'équilibre, au cas de chapelets de nucléosomes variants. Les résultats font l'objet du chapitre suivant.

4 A l'équilibre : Les oligo-nucléosomes

Dans cette partie, nous abordons l'organisation et la dynamique de fibres de nucléosomes comportant de 5 à 32 nucléosomes positionnés. Comme nous l'avons vu dans le chapitre 3, l'utilisation de la microscopie à force atomique associée à une analyse automatisée des images et une modélisation physique permet de caractériser l'impact du remplacement d'un histone conventionnel H2A par un histone variant H2A.Bbd. En particulier, nous avons pu mettre en évidence des modifications structurelles et dynamiques des nucléosomes H2A.Bbd et les relier à la structure particulière de ce variant d'histone. Pour nous rapprocher de la situation physiologique, nous avons donc étendu cette étude au cas de fibres de chromatine afin de tenter de répondre à des questions telles que : ces différences structurelles et dynamiques sont-elles encore présentes pour des fibres de chromatines variantes et conventionnelles ? Est-il possible de faire quantitativement le lien avec ce que nous avons mesuré à l'échelle du mono-nucléosome ?

L'intérêt de notre méthodologie pour répondre à ces questions est que l'utilisation de surfaces chargées comme l'AP-mica associée à la mesure directe et résolue au nanomètre de la conformation des molécules permet de capter de multiples instantanés de la configuration des pelotes de chromatine. A la différence des nombreux travaux réalisés par AFM et cryoEM sur la fibre de chromatine ((Bednar *et coll.* 1998; d'Erme *et coll.* 2001; Karymov *et coll.* 2001) et pour une revue voir (Zlatanova *et coll.* 2003)) nous nous affranchissons de l'utilisation d'un fixateur chimique. Ceci nous permet alors d'extraire des paramètres dynamiques et structuraux du système pour des échelles allant du nanomètre à la centaine de nanomètres. En comparaison les techniques les plus utilisées comme l'ultracentrifugation, la diffraction des rayons X ou des neutrons (Gerchman *et coll.* 1987) ne donnent accès qu'à des mesures globales nécessitant de grandes quantités de matériel. Les fortes concentrations d'objets requises par ces différentes méthodes ne permettent pas, dans ce cas, d'exclure des interactions non souhaitées entre pelotes (Zhou *et coll.* 2007).

Dans ce contexte, en collaboration avec Hervé Menoni (pour la partie biochimie) et Martin Castelnovo (pour la modélisation) nous avons tenté d'analyser l'impact du variant H2A.Bbd avec la même approche qui consiste à utiliser le système le plus contrôlé possible et à extraire par l'imagerie AFM des quantités statistiques qui nous permettront de caractériser *in fine* les propriétés mécaniques de ces poly-nucléosomes variants.

4.1 Fibres nucléosomales conventionnelles

4.1.1 Reconstitution et visualisation

Les chapelets nucléosomiaux ont été reconstitués par Hervé Menoni sur des fragments d'ADN de 1, 1.8, 3 et 6.3 kpb contenant respectivement 5, 9, 15 et 32 séquences 601 (longueur de

répétition = 197 pb) par dialyse. L'utilisation de ce type de séquences (grâce à d'une collaboration avec Daniela Rhodes à Cambridge (Robinson *et coll.* 2006)) nous a permis d'obtenir des chromatines très bien positionnées et de nous affranchir ainsi de l'effet du positionnement des nucléosomes sur la structure et l'organisation de la chromatine. L'ajout de petits fragments d'ADN compétiteurs permet d'augmenter le rapport histones/ADN lors de la reconstitution afin d'obtenir un fragment long d'ADN saturé en nucléosomes tout en évitant des phénomènes d'aggrégation des histones sur l'ADN. La méthode consistant à reconstituer les chromatines variantes et conventionnelles à partir d'éléments purifiés individuellement nous permet d'éviter la présence de protéines annexes, comme c'est le cas pour les chromatines purifiées ou les extraits cellulaires, qui sont susceptibles de modifier la dynamique de nos chromatines (aucun histone de liaison, ou polycations par exemple). De plus, la reconstitution par dialyse nous permettra par la suite, tout comme pour les mono-nucléosomes, de remplacer l'histone H2A par le variant H2A.Bbd (ou l'histone chimère Bbd.ddH2A) afin de reconstituer des fibres nucléosomales variantes.

La première étape consiste à visualiser des fibres de nucléosomes conventionnelles par AFM. Pour ce faire nous avons utilisé les mêmes surfaces AP-mica qui nous ont permis de piéger la configuration des mono-nucléosomes. Les études précédentes menées sur des objets très fragiles comme de longs fragments d'ADN, des nœuds d'ADN ou des assemblages protéiques complexes (Tiner *et coll.* 2001; Gaillard *et coll.* 2002; Lyubchenko *et coll.* 2002; Valle *et coll.* 2005; Mikhiekin *et coll.* 2006; Ercolini *et coll.* 2007) montrent que ce type de surface permet de conserver l'organisation présente à 3D en la projetant à 2D même pour des objets dont la taille et la flexibilité sont de l'ordre de celles des chromatines que nous avons visualisées.

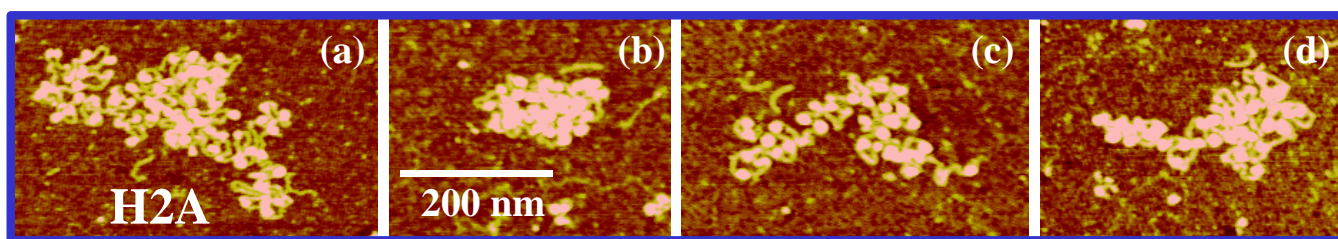


Figure 99 : Quelques exemples de chromatines conventionnelles

Images AFM de topographie de fibres de chromatine conventionnelle, reconstituées sur un fragment ADN formé de 32 répétitions de séquences positionnantes 601 (longueur de répétition = 197 pb). Echelle Z : de 0 (marron foncé) à 1.5 nm (blanc rosé). On remarque le caractère compact de ces structures et dans certains cas la formation d'une organisation locale en fibre (c) et (d). On observe aussi sur certaines images (a par exemple) des fibres interconnectées (fibres doubles).

On observe sur la Figure 99 quelques images AFM typiques de fibres de chromatine reconstituées sur des tels fragments (ici 32 répétitions). On remarque tout d'abord que ces fibres sont bien saturées en nucléosomes régulièrement espacés (comme le confirme des expériences de digestion partielle à la microcoque nucléase, données non présentées). Comme on le voit sur les images AFM, le chapelet nucléosomal forme dans les conditions expérimentales utilisées (force ionique ~ 15 mM) une fibre compacte de type 'fibre de 30 nm'. L'échelle de couleur permet de vérifier que la configuration des chapelets sur la surface est bien 2D. La compaction de la fibre est telle que la trajectoire d'ADN entre chacun des nucléosomes (ADN de liaison ~ 50 pb) n'est pas toujours visible, on distingue néanmoins la plupart des nucléosomes. La mesure de la longueur complexée d'ADN étant dans ce cas impossible, nous nous sommes concentrés sur la mesure des positions respectives des NCPs de la pelote ainsi que l'aire projetée et le volume des NCPs de la pelote. La méthode utilisée pour extraire ces paramètres est décrite dans la section 2.2.5, et nous présentons maintenant les résultats de ces mesures quantitatives.

4.1.2 Analyse quantitative de la conformation des fibres nucléosomales

Pour chaque objet 'fibre' identifié à l'aide du script Matlab, on peut mesurer des paramètres à l'échelle globale tels que : A_{NCP} l'aire occupée par l'ensemble des NCPs de la fibre, A_{totale} l'aire totale occupée par les NCPs et l'ADN de la fibre, $A_{Ellipse}$ l'aire de la plus petite ellipse qui contient 95% des nucléosomes de la fibre, C_{2d} la compacité 2D définie comme $C_{2d} = A_{totale} / A_{Ellipse}$, R_g , le rayon de giration, qui représente la distance moyenne des nucléosomes au centroïde de la fibre et :

$$R_g^2 = \frac{1}{N^2} \sum_{i=1}^N \sum_{j=1}^N d_{ij}^2$$

où d_{ij} représente la distance entre les centroïdes des nucléosomes i et j au sein d'une fibre, ou encore R_{hydro} , le rayon hydrodynamique défini comme :

$$\frac{1}{R_H} = \frac{1}{N(N-1)} \sum_{i=1}^N \sum_{j=1, j \neq i}^N \frac{1}{d_{ij}}.$$

On peut également évaluer des paramètres structuraux à l'échelle locale, tels que : d_{1er_voisin} la distance moyenne au premier voisin au sein d'une fibre

$$d_{1er\ voisin} = \frac{1}{N} \sum_i \min_j d_{ij}$$

et de manière similaire $d_{nième_voisin}$ la distance au $n^{ième}$ voisin, ou $d_{inter\ nuc}$ la distance moyenne entre nucléosomes au sein d'une fibre calculé à partir de l'aire totale de la pelote en supposant que chaque nucleosome occupe un disque de rayon $d_{inter\ nuc} / 2$:

$$d_{inter\ nuc} = 2 \sqrt{\frac{A_{totale}}{\pi N}}$$

	Nombre de répétitions	Total $N_{fibre} - N_{nucl}$	Moyenne $N_{nucl} / fibre$	Rayon de giration (nm)	Rayon hydro. (nm)	Distance au 1er voisin (nm)	Distance inter-nuc. (nm)
H2A	5	1335 - 6185	$4,63 \pm 0,01$	$22,1 \pm 0,1$	$28,8 \pm 0,1$	$21,2 \pm 0,1$	$26,8 \pm 0,1$
	9	261 - 2338	$8,96 \pm 0,06$	$32,6 \pm 0,4$	$35,5 \pm 0,3$	$19,8 \pm 0,1$	$26,4 \pm 0,1$
	15	551 - 8177	$14,79 \pm 0,06$	$53,7 \pm 0,5$	$50,2 \pm 0,3$	$21,5 \pm 0,1$	$28,7 \pm 0,1$
	32	54 - 1629	$30,2 \pm 0,4$	$71,8 \pm 2,2$	$62,5 \pm 1,1$	$20,1 \pm 0,3$	$28,5 \pm 0,3$
H2A.Bbd	9	132 - 1116	$8,45 \pm 0,08$	$46,0 \pm 1,1$	$47,6 \pm 0,8$	$26,2 \pm 0,3$	$30,4 \pm 0,3$
	32	19 - 593	$31,2 \pm 0,7$	$88,1 \pm 4,9$	$73,2 \pm 2,9$	$21,7 \pm 0,3$	$30,0 \pm 0,7$
Bbd.ddH2A	9	112 - 995	$8,9 \pm 0,1$	$50,2 \pm 1,1$	$50,9 \pm 0,9$	$26,8 \pm 0,3$	$32,8 \pm 0,4$
	32	28 - 795	$28,4 \pm 0,5$	$95,3 \pm 4,4$	$79,7 \pm 2,6$	$24,2 \pm 0,3$	$29,9 \pm 0,5$

Tableau 3 : Valeurs moyennes des paramètres mesurés pour les fibres conventionnelles, variantes et chimères.

Ces différents paramètres sont issus de l'analyse quantitative des images AFM et décrivent la structure de la fibre de chromatine à l'échelle globale et locale.

Enfin, nous mesurons N_{nucs} le nombre de nucléosomes présents au sein de chaque fibre. L'ensemble des résultats pour l'estimation de ces différents paramètres décrivant la structure de la fibre de chromatine conventionnelle est reporté dans le Tableau 3. Pour ce calcul, seules les pelotes

ayant un nombre de nucléosomes/fibre en accord avec celui attendu pour les différentes constructions sont retenues ($4 \leq N_{nuc} \leq 5$ pour 5 répétitions de séquences positionnantes 601, $7 \leq N_{nuc} \leq 10$ pour 9 répétitions, $12 \leq N_{nuc} \leq 17$ pour 15 répétitions et $25 \leq N_{nuc} \leq 35$ pour les 32 répétitions). Ces critères permettent d'éliminer les pelotes 'doubles', trop proches sur la surface pour être séparées lors de l'analyse d'images, voire les pelotes interpénétrées ou les pelotes sous-saturées en nucléosomes.

Pour les longues pelotes conventionnelles (32 répétitions), on trouve une distance moyenne inter-nucléosomale $\langle d_{inter\ nuc} \rangle = 28.5 \pm 0.3$ nm et la valeur trouvée est proche pour toutes les longueurs de fibres analysées (5 à 32 nucléosomes). On peut comparer les valeurs obtenues pour les paramètres locaux à d'autres mesures par AFM sur des fibres de chromatine native. En particulier, la distance moyenne entre premiers voisins et la distance moyenne inter-nucléosomale sont cohérentes avec les données de Kepert *et al.* (Kepert *et coll.* 2005). Dans leurs expériences AFM sur des fibres natives de chromatine extraite de cellules HeLa et déplétée de l'histone de liaison H1, ils obtiennent des valeurs moyennes de 17.6 ± 0.1 nm pour la distance d'un nucléosome à son premier voisin et de 27.6 ± 0.6 nm pour la distance inter-nucléosomale. Malgré les différences dans l'origine des chromatines étudiées et dans les conditions de dépôts et d'imagerie utilisées, les similarités des résultats montrent que les caractéristiques structurales extraites des données sont bien intrinsèquement liées à la structure de la chromatine.

4.1.3 Effet de l'histone de liaison H1

Pour vérifier que notre méthodologie (en particulier la surface AP-mica) n'interfère pas avec la capacité de la chromatine à se compacter nous avons visualisé l'effet de l'incorporation de l'histone de liaison H1 à nos chromatines. Nous avons donc ajouté H1 dans une quantité proche de celle des autres histones en présence de NAP1 connue pour être une chaperonne d'histones compétente pour incorporer H1 (Zlatanova *et coll.* 2007). La Figure 100 présente des images AFM réalisées après incubation des chromatines avec l'histone de liaison pour différentes quantités d'histone de liaison. On observe une compactification importante de la structure dans laquelle il est alors pratiquement impossible de discerner un nucléosome en particulier. Ce résultat est néanmoins partiel puisque nous n'avons pas vérifié la liaison spécifique de l'histone de liaison en position entrée-sortie du nucléosome (comme cela semblait cependant être le cas pour les mono-nucléosomes, cf. section 3.3.3) et puisque H1 est connu pour pouvoir se lier non spécifiquement avec l'ADN. Dans tous les cas, cette expérience montre que l'ajout de cette histone de liaison en solution induit bien une compaction de la structure visualisable en AFM.

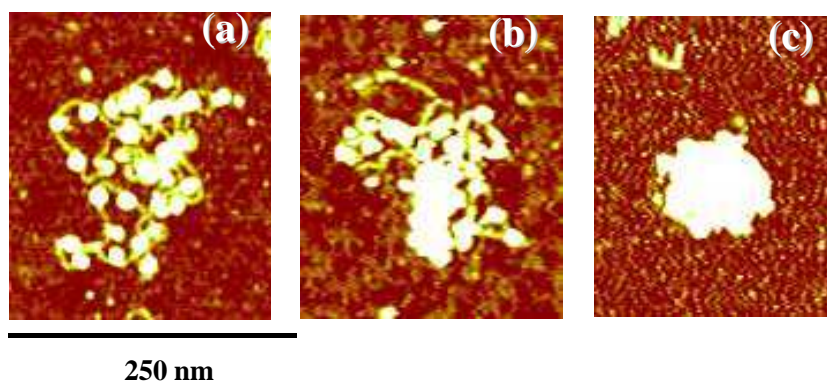


Figure 100 : Effet de l'histone de liaison H1 sur la compaction de la fibre conventionnelle

Image de AFM de topographie de chromatines de 32 répétitions déposées sur une surface AP-mica après avoir incubé 30 min en présence de NAP1 et (a) aucun histone de liaison H1 (b et c) des quantités croissantes de l'histone de liaison. Echelle Z : de 0 à 2.5 nm.

4.2 Fibres nucléosomales variantes H2A.Bbd

4.2.1 Visualisation des chromatines variantes

Nous avons ensuite évalué l'impact du remplacement de H2A par H2A.Bbd. Pour ce faire nous avons visualisé dans les mêmes conditions que précédemment des pelotes reconstituées de nucléosomes H2A.Bbd (Figure 101). Tout d'abord, nous remarquons que tout comme pour les fibres conventionnelles, la saturation est bonne et les nucléosomes semblent positionnés régulièrement le long de l'ADN contenant les répétitions de séquences 601. D'autre part, comme on peut le voir clairement sur la Figure 101, les fibres nucléosomales variantes sont plus ouvertes, plus relâchées et ressemblent à des chapelets de nucléosomes (structure de type 'collier de perles'). Tout se passe comme si l'ouverture et la flexibilité de ce « polymère » de nucléosomes était modifiée. Cette différence entre fibres variantes et conventionnelles persiste lorsque l'on change le nombre de répétitions.

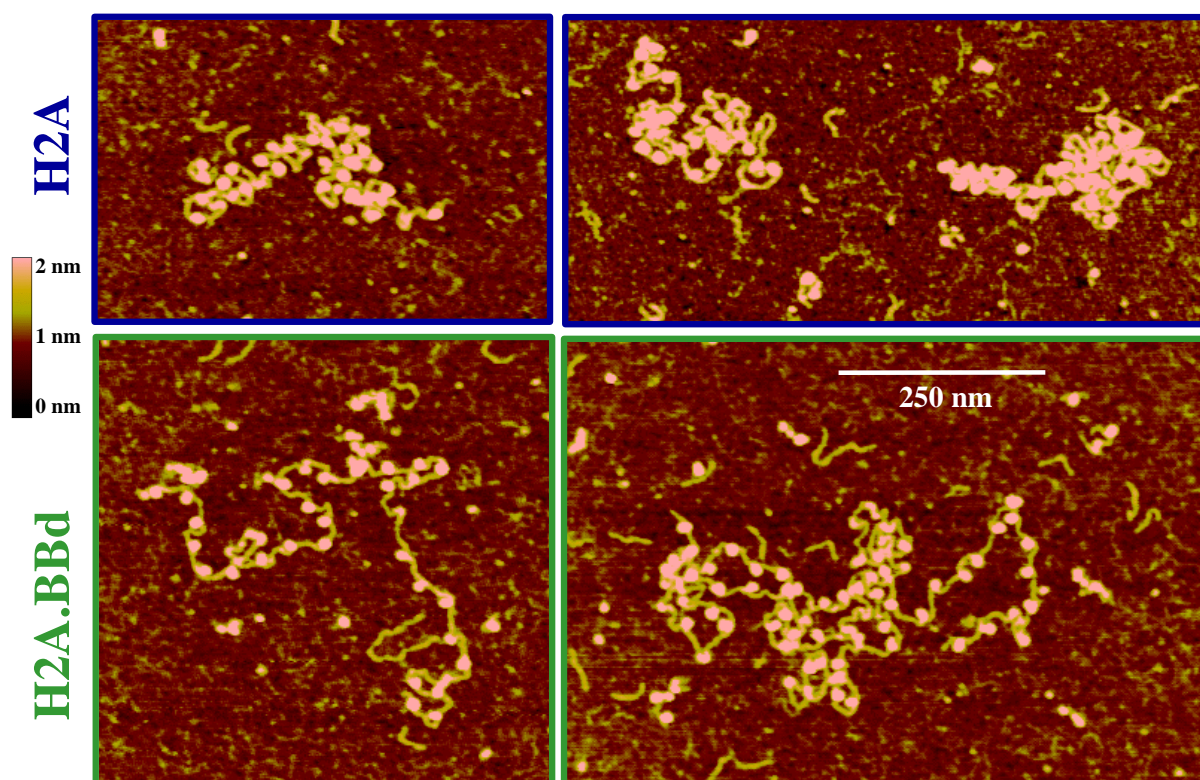


Figure 101 : Exemples de fibres conventionnelles H2A et variantes H2A.Bbd

Images AFM de topographie. Fibres nucléosomales (en haut) conventionnelles et (en bas) variantes reconstituées sur un substrat ADN formé de 32 répétitions de séquences positionnantes 601. On remarque le caractère beaucoup plus ouvert des fibres variantes qui forment une structure en 'collier de perles' très différente de la fibre compacte formée par les nucléosomes conventionnels.

De la même manière que pour les pelotes conventionnelles, nous allons analyser les images AFM des pelotes variantes en mesurant les paramètres structuraux définis précédemment (voir section 4.1.2), afin de pouvoir les comparer quantitativement.

4.2.2 Comparaison avec les fibres conventionnelles

On s'aperçoit que les différences avec les fibres conventionnelles sont présentes tant à l'échelle locale qu'à l'échelle globale (Tableau 3). En effet, on peut remarquer, par exemple, que les distributions de rayon de giration et de distance 1^{er} voisin sont différentes pour les fibres de nucléosomes conventionnels et variants (Figure 102).

A l'échelle locale, la distribution de distances d'un nucléosome de la pelote à son premier voisin pour les fibres de chromatine variante H2A.Bbd est significativement élargie et asymétrique, par rapport aux fibres conventionnelles. Ceci reflète une tendance accrue des nucléosomes variants à être moins localisés et par conséquent à former une fibre moins compacte localement.

A l'échelle globale, cette différence de compaction se retrouve également dans la comparaison de rayons typiques tels que le rayon de giration ou le rayon hydrodynamique. Le rayon de giration moyen des fibres variantes de 32 nucléosomes est $R_{g_H2A.Bbd} = 88.1 \pm 4.9$ nm, alors qu'il vaut $R_{g_H2A} = 71.8 \pm 2.2$ nm pour les fibres conventionnelles. Ce type de comparaison à l'échelle globale a déjà été effectué par Tremethick *et coll.* (Zhou *et coll.* 2007) en étudiant la sédimentation de fibres de 12 nucléosomes par ultracentrifugation. Nos mesures pour des fibres de 9 nucléosomes sont qualitativement en accord avec les leurs, l'écart pouvant être facilement expliqué par différentes conditions de tampon et le passage des fibres de 3D à 2D. De plus, l'utilisation de l'analyse d'image permet, dans notre cas, d'aller au-delà de la valeur moyenne et d'étudier toute la distribution de rayon de giration pour les fibres analysées. A nouveau, nous observons un élargissement de la distribution pour les fibres variantes (Figure 102) cohérent avec un degré de compaction plus faible dans ce cas. Malheureusement, la recherche d'une loi d'échelle pour l'évolution de R_g avec le nombre de nucléosomes est limitée, la gamme d'échelles accessibles expérimentalement étant trop faible

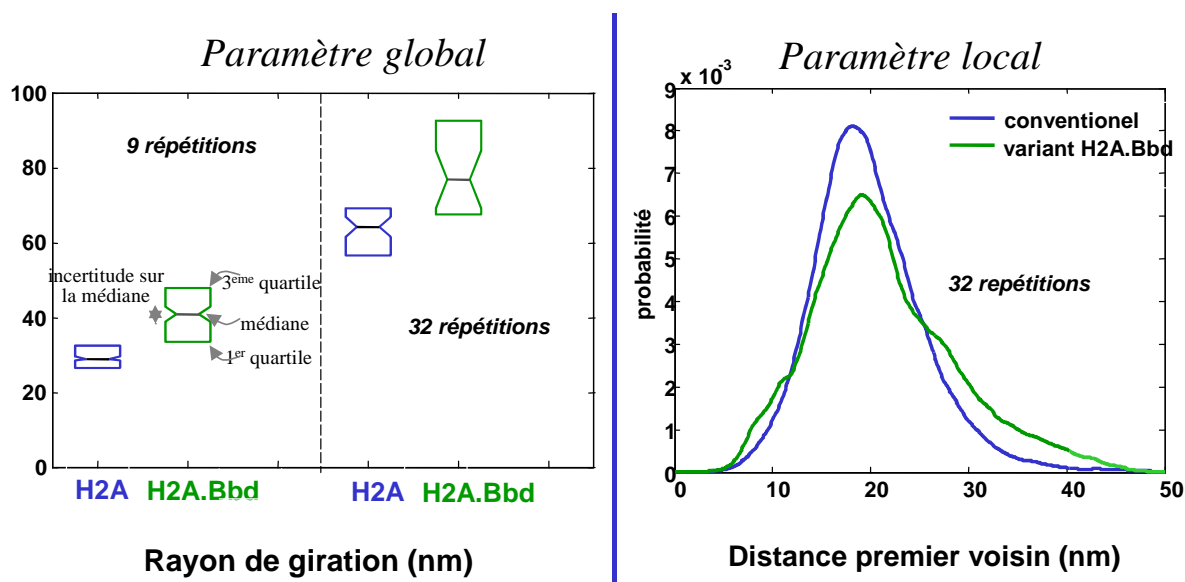


Figure 102 : Deux paramètres extraits des images AFM pour les chromatines conventionnelles H2A et variantes H2A.Bbd

(à gauche) Un paramètre décrivant l'organisation locale de la chromatine : le rayon de giration des pelotes. Les distributions sont présentées sous forme de 'boxplot' représentant la médiane (ligne au milieu) ainsi que les premiers (ligne du bas) et derniers (ligne du haut) quartiles. On remarque le caractère moins compact des fibres variantes pour 9 et 32 répétitions. (à droite) Un paramètre décrivant l'organisation locale de la chromatine, la distance moyenne d'un nucléosome à son premier voisin. On remarque la plus grande variabilité de distances pour la chromatine variante

En résumé, nous avons montré qu'à la fois à l'échelle locale et à l'échelle globale, la fibre de chromatine variante est statistiquement plus ouverte et moins organisée que la fibre conventionnelle.

4.3 Modélisation : du facteur de structure à la mécanique des fibres nucléosomales

4.3.1 Définition et calcul du facteur de structure

Comme on le voit ces deux types de fibres se comportent donc de manière différente aux échelles extrêmes accessibles par l'AFM. Mais qu'en est-il pour les échelles intermédiaires ? Pour rendre compte de toute l'information présente dans les images nous avons donc choisi de compléter cette étude en employant un outil qui permet de caractériser ces structures chromatiniennes simultanément et à toutes les échelles accessibles : le facteur de structure $S(q)$.

Cet outil est une fonction de q représentant l'inverse d'une distance. On la calcule à partir des distances d_{ij} entre chaque NCP (ou plus généralement entre objets d'une structure) selon :

$$S(q) = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N \sum_{j=1}^N J_0(q \cdot d_{ij})$$

où N est le nombre de NCP pour la pelote considérée et J_0 est la fonction de Bessel de première espèce. Usuellement on obtient cette donnée $S(q)$ comme le résultat d'expériences de diffraction de rayons X (SAXS) ou de neutrons (SANS) à partir de mesures 3D faites dans l'espace réciproque². C'est pourquoi il existe une large littérature en physique des polymères (de Gennes 1979; Koch *et coll.* 2003; Boué *et coll.* 2007; Lipfert *et coll.* 2007), où les différents comportements de cette fonction ont été étudiés. Ces techniques de diffraction ont été également appliquées à l'étude de la structure de la chromatine et en particulier de la fibre de 30 nm dans les années 80 (Carlson *et coll.* 1976; Spencer *et coll.* 1980; Gerchman *et coll.* 1987; Lowary *et coll.* 1989). En nous plaçant dans ce contexte, nous allons utiliser ces résultats pour proposer comme nous le verrons un modèle mécanique quantitatif de nucléosomes au sein d'une fibre de chromatine. Très grossièrement, tout se passe comme si, à une échelle $1/q$ donnée, on comptait la proportion des distances dans la structure qui sont inférieures à cette valeur $1/q$ et que l'on représentait ce résultat en fonction de q , l'inverse de cette échelle³. Pour un polymère réel de longueur finie, on appelle régime de Guinier la région $1/q > R_g$ (où $S(q) = \mathcal{N}(0, 1/R_g)$ et $\mathcal{N}(x, y)$ est une gaussienne centrée sur x et de largeur y)

D'une manière générale, considérons le cas d'un polymère gaussien c'est à dire un modèle de polymère infini où l'orientation de chacun des monomères est indépendante du reste de la pelote (chaîne aléatoire sans interactions). Il est connu que dans le cas d'une chaîne infinie et pour $1/q \gg a$ (où a est la taille du maillon élémentaire), on a : $S(q) \propto q^{-2}$. De même pour un polymère complètement rigide (bâton rectiligne), $S(q) \propto q^{-1}$. Enfin pour un polymère compact (interaction attractive entre monomères), on a : $S(q) \propto q^\alpha$ où α est compris strictement entre -2 et -4 (modèle de Porod ou globulaire) (Figure 103).

² Dans ce cas on ne calcule pas le facteur de structure à partir de la fonction de Bessel J_0 mais à partir du sinus cardinal du produit des distances et de q .

³ C'est ce qu'on obtient en approximant la fonction de Bessel par une fonction porte de largeur $1/q$

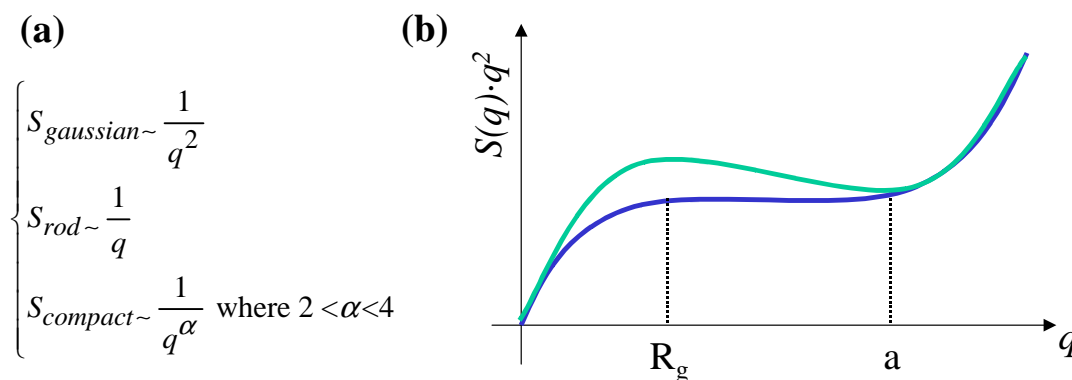


Figure 103 : Facteurs de structures, modèles de polymère et « Kratky plot »

(a) Lois d'échelles du facteur de structure pour des polymères idéaux : gaussien (chaîne aléatoire infinie sans interactions), complètement rigide (en bâtonnet) ou compact (interactions entre les monomères ou formation de globules). R_g est le rayon de giration de la pelote, a la taille du monomère, q représente l'inverse d'une distance. (b) Représentation en « Kratky plot » ($q^2 S(q)$ en fonction de q) pour (en bleu) un polymère réel sans interaction (par exemple l'ADN) et (en vert) un polymère réel présentant un régime compact à une certaine échelle que l'on peut visualiser par une bosse (par exemple l'ARNt). Pour $1/q > R_g$, on a le régime de Guinier ; pour $R_g < 1/q < a$ on a un régime intermédiaire gaussien (courbe bleu) ou compact (courbe verte) ; pour $1/q > a$, on a un régime en batonnet rigide.

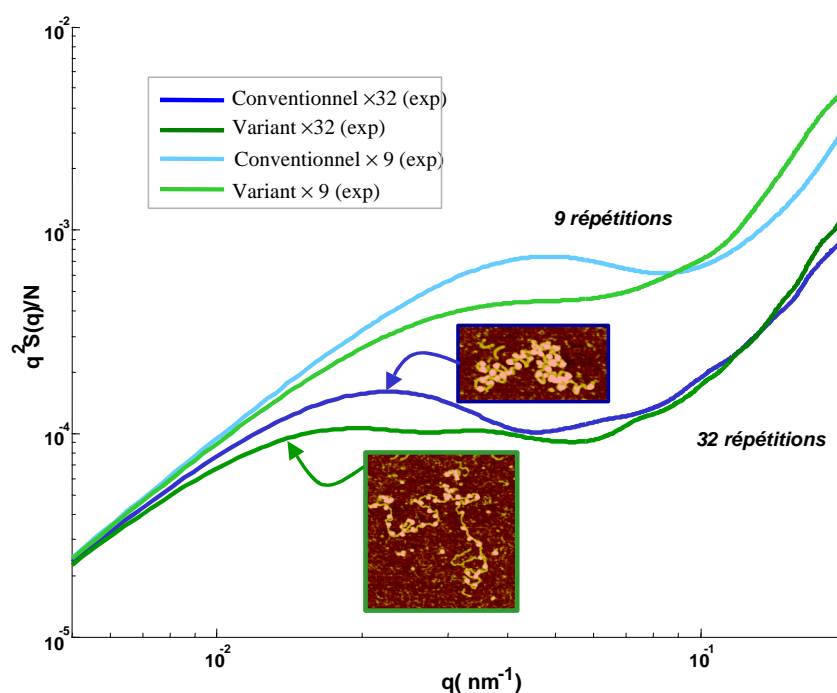


Figure 104 : Représentation en Kratky plots des facteurs de structures expérimentaux pour les fibres conventionnelles et variantes

On superpose les facteurs de structures expérimentaux obtenus pour les fibres conventionnelles et variantes de 9 ou 32 répétitions. On remarque que, pour un nombre de répétitions donné, les kratky-plots sont semblables, excepté dans le régime intermédiaire compris entre le rayon de giration de la pelote et la taille d'un nucléosome. Dans cette zone les courbes obtenues pour les fibres variantes présentent un plateau alors que l'on observe un maximum local puis une décroissance pour celles obtenues pour les fibres conventionnelles.

Dans le cas d'un polymère réel sans interactions (comme l'ADN par exemple), on a donc trois régimes : le régime de Guinier (pour $1/q > R_g$), le régime intermédiaire gaussien (pour

$R_g < 1/q < a$) et enfin le régime de bâtonnet rigide (pour $1/q > a$). Il est alors pratique de représenter non pas $S(q)$ mais $q^2 S(q)$ en fonction de q (Pérez *et coll.* 2001). Dans cette représentation appelée « Kratky plot », pour les échelles où le polymère est moins compact que le modèle gaussien, la courbe est ascendante alors que pour les échelles où il est plus compact, elle est décroissante. Enfin, les échelles pour lesquelles le polymère est gaussien sont représentées par un plateau. Par conséquent comme indiqué sur le schéma de la Figure 103 pour un polymère réel sans interaction on a un régime croissant puis un plateau et enfin une droite de pente 1 représentation log-log. En outre si l'on considère un polymère compact à une échelle donnée, du fait d'interactions attractives électrostatiques par exemple, on obtiendra un régime décroissant à l'échelle considérée dans ce type de représentation.

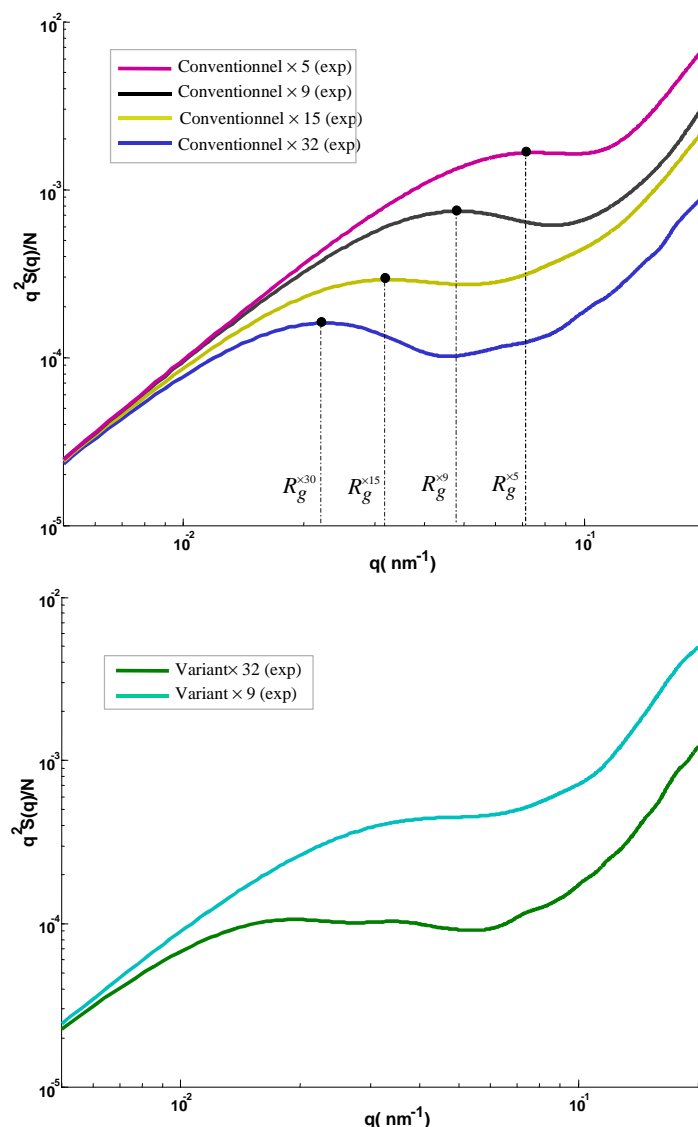


Figure 105 : Représentation en Kratky plots: effet du nombre de nucléosomes dans la fibre

Nous avons comparé les facteurs de structure représentés sous forme de kratky-plots pour des pelotes expérimentales (en haut) conventionnelles et (en bas) variantes de différentes longueurs. On remarque que, dans les deux cas, lorsque le nombre de répétitions augmente, la forme des courbes reste la même : deux régimes ascendants de part et d'autre d'un plateau pour le variant et deux régimes ascendants de part et d'autre d'une décroissance pour le conventionnel. Nous avons marqué pour les fibres conventionnelles la position des rayons de giration expérimentaux. On vérifie ainsi que pour chaque nombre de répétitions, ceux-ci correspondent bien à l'échelle des maxima locaux observés.

Si l'on calcule les facteurs de structures expérimentaux à partir de toutes les données obtenues pour les fibres variantes et conventionnelles de différentes longueurs, on obtient alors le graphe présenté dans la Figure 105. Comme on le voit les fibres conventionnelles et variantes ont, pour un nombre de répétition donné, des comportements similaires à l'exception de l'échelle proche de R_g . Dans le cas des fibres conventionnelles on voit en effet apparaître une « bosse », caractéristique d'une zone compacte absente pour les fibres variantes. On observe pour chaque sorte de fibre, le même type de régimes, indépendamment du nombre de répétitions utilisées. Ceci confirme que nous sommes capables de visualiser les différents régimes du polymère chromatine et que nous sommes capables de discriminer dans cette représentation les fibres variantes des fibres conventionnelles, confirmant l'impression visuelle des images (Figure 101).

4.3.2 Un modèle dynamique simple pour les fibres de chromatine vues par AFM

Pour pouvoir extraire plus d'information des facteurs de structure, nous avons, en collaboration avec Martin Castelnovo, construit un modèle mécanique simple pour décrire les données expérimentales. Ce modèle est basé sur trois ingrédients majeurs (Figure 106):

- La répulsion stérique des NCPs
- La géométrie particulière de l'ADN enroulé autour du nucléosome (Figure 107)
- Les paramètres dynamiques issus de l'étude menée sur les mono-nucléosomes.

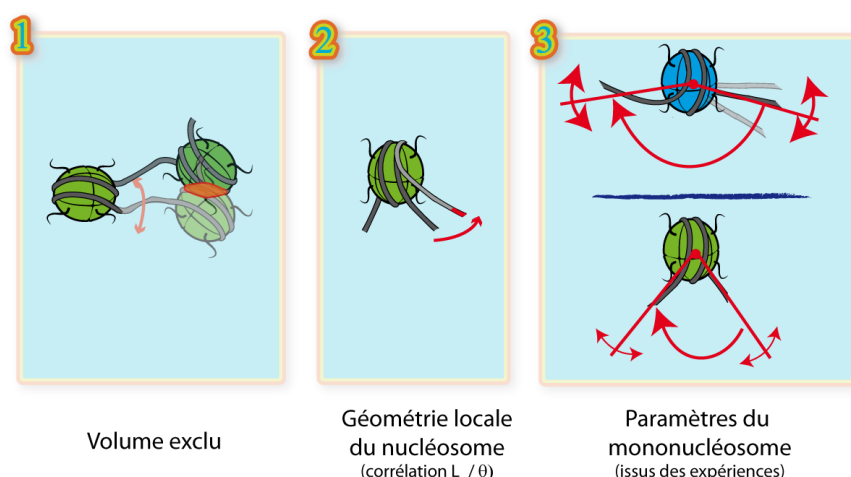


Figure 106 : Ingrédients de la modélisation des fibres de chromatine

(1) Le volume exclu interdit le recouvrement des nucléosomes entre eux. (2) La géométrie locale du nucléosome relie l'angle d'ouverture des bras ADN avec la longueur de l'ADN de liaison. (3) Les paramètres extraits des mesures sur les mono-nucléosomes conventionnels et variants imposent l'angle d'ouverture moyen et l'écart type des fluctuations pour chaque type de nucléosomes.

A partir de ces ingrédients nous avons donc réalisé une simulation numérique nous permettant de construire des polymères sur réseau contraints par ces règles. Chaque pelote est construite itérativement par ajout d'un monomère à la pelote existante. Pour le monomère $i+1$, le maillon i représente le bras amont du nucléosome $[i, i+1]$ et l'orientation du bras $i+1$ est tirée aléatoirement suivant une distribution correspondant à celle mesurée sur les mono-nucléosomes. La distribution angulaire utilisée est directement issue du modèle proposé pour rendre compte de la dynamique de longueur complexée des mono-nucléosomes c'est à dire une distribution laplacienne centrée sur l'angle moyen mesuré (voir section 3.2.1) et de largeur donnée par la distribution de longueur complexée ($\sigma_\theta = \sigma_{L_c} \cdot \pi/42$). On ne prend donc pas en compte à ce niveau l'asymétrie de la

distribution de longueur complexée. La longueur de l'ADN de liaison est directement reliée à l'orientation puisque nous répercutons une ouverture plus grande (ou plus petite) que l'angle moyen du nucléosome sur la longueur de cet ADN en considérant que l'ADN est simplement enroulé tangentiellement à la surface de la partie protéique formant un cylindre de 4.5 nm de rayon. Si la position du nucléosome $[i+1, i+2]$ qui vient d'être tirée chevauche un nucléosome pré-existant, on tire alors selon la même loi une nouvelle orientation et l'on teste à nouveau le contact avec les autres nucléosomes.

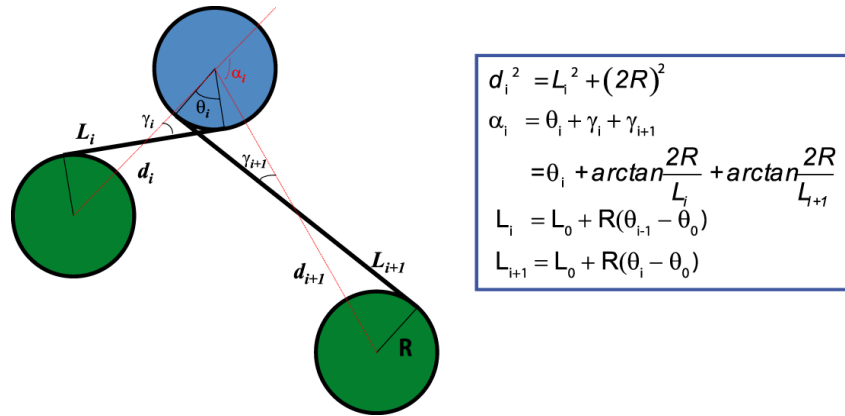


Figure 107 : Modèle géométrique pour la simulation de fibres de nucléosomes

Représentation schématique du modèle géométrique utilisée pour la simulation des chapelets de nucléosomes, montrant la relation entre la longueur d'ADN complexée, la longueur de l'ADN de liaison L_i et l'angle d'ouverture du nucléosome θ_i .

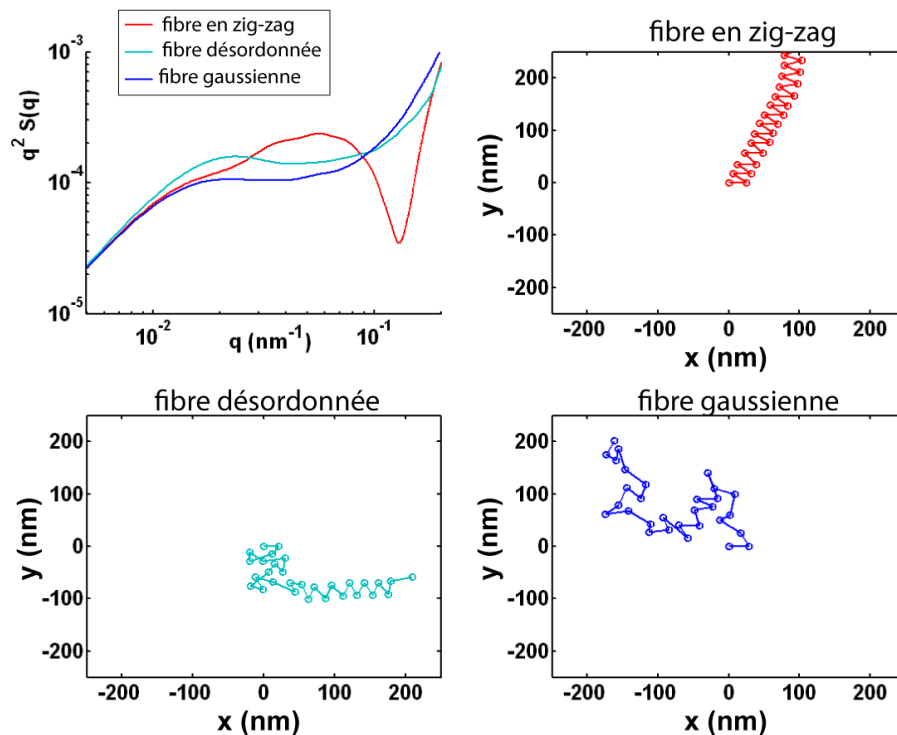


Figure 108 : Exemple de "Kratky plots" pour des fibres modèles simulées

Simulation de fibres 'modèles' de 30 nucléosomes et Kratky plots correspondants ($q^2 S(q)$ en fonction de q) pour (en rouge) une fibre zig-zag, (en cyan) une fibre désordonnée et (en bleu) une fibre gaussienne. Les facteurs de structure sont moyennés sur 500 réalisations et une trajectoire typique de fibre est représenté à titre d'exemple.

Avec cette procédure nous construisons donc un polymère 2D possédant les propriétés structurales et dynamiques du type de nucléosome considéré (Figure 108). La conformation produite ne correspond pas à une configuration d'équilibre pour le polymère puisque que nous laissons pas le polymère relaxer comme dans une procédure de Monte-Carlo mais plutôt une configuration piégée la plus proche possible de ce qui se passe lorsque la fibre de nucléosome est adsorbée progressivement par une de ses extrémités sur la surface AP-mica où elle reste piégée. Cette simulation est, bien entendu, très simplificatrice par rapport à une simulation dynamique qui prendrait en compte la mécanique complexe du déroulement de l'ADN et l'interaction entre la surface chargée et l'ADN. Néanmoins, elle nous permet de prendre en compte simplement l'effet de la surface tout en modélisant la dynamique d'un mono-nucléosome au sein d'un chapelet nucléosomal. L'intérêt de l'approche est, en outre, qu'elle nous permet d'injecter les paramètres extraits des expériences sur les mono-nucléosomes dans un modèle de fibre de chromatine, ce qui fait que l'ouverture et la flexibilité des nucléosomes du chapelet ne sont pas des paramètres libres mais des données expérimentales.

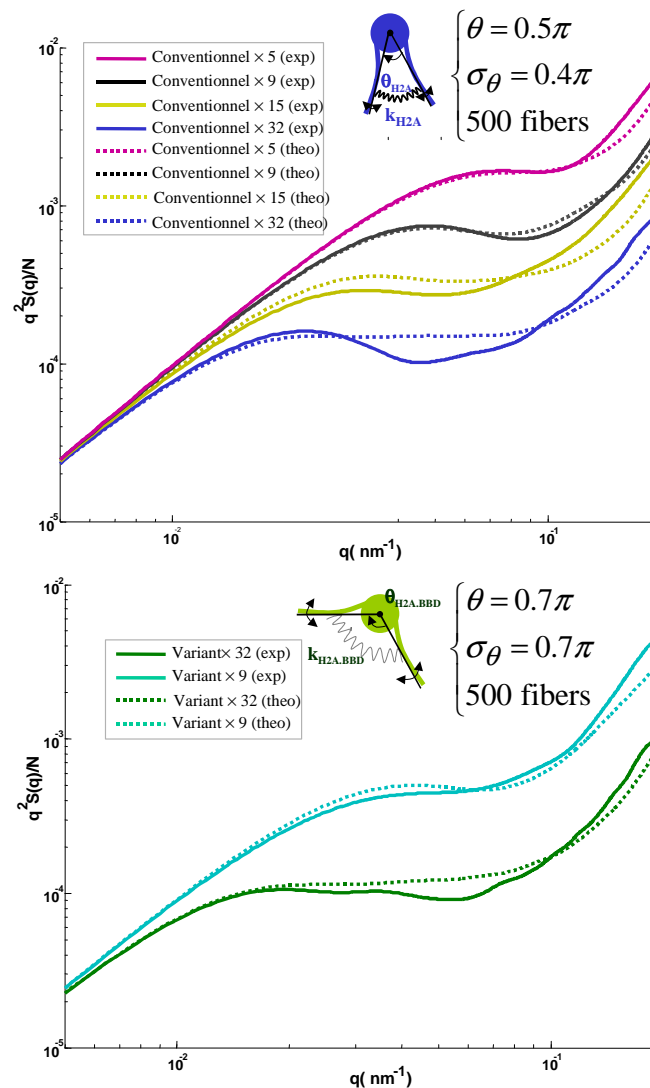


Figure 109 : Comparaison des kratky-plots expérimentaux et simulés

Nous avons comparé les facteurs de structure issus des pelotes expérimentales et simulées. Chaque simulation correspond à 500 réalisations. Les fibres simulées sont formées de 5, 9, 15 et 30 nucléosomes ce qui correspond aux valeurs moyennes expérimentales de $N_{\text{nucl}}/\text{fibre}$. Pour chaque type de simulation nous avons utilisé les paramètres dynamiques du mono-nucléosome correspondant c'est à dire : un angle d'ouverture $\theta = 0.5\pi$ et une flexibilité $\sigma_\theta = 0.4\pi$ pour les fibres conventionnelles et $\theta = 0.7\pi$ et $\sigma_\theta = 0.7\pi$ pour les fibres variantes. Le paramètre de rayon effectif est de 8.5 nm.

Il est à noter toutefois que cette modélisation comporte encore un paramètre supplémentaire qui est le rayon effectif utilisé pour prendre en compte le volume exclu. En effet si l'on utilise un rayon minimal de 5.5 nm (celui du nucléosome) on obtient alors une distribution des distances au premier voisin maximum pour $5.5 \times 2 = 11$ nm (alors que pour la distribution expérimentale la distance la plus probable est 18 nm) et un rayon de giration inférieur aux données expérimentales. En utilisant un rayon effectif de $17/2 = 8.5$ nm, on obtient pour les fibres simulées une distribution de distance au premier voisin très similaire à notre distribution expérimentale et un rayon de giration identique à celui mesuré (données non montrées). Tout se passe donc comme si les nucléosomes ne pouvaient se rapprocher plus que ce rayon effectif dans nos conditions expérimentales. Il existe donc une force de répulsion à distance qui peut correspondre à un effet de surface ou une répulsion électrostatique entre les NCPs dont la distance caractéristique est 8.5 nm. Cette valeur optimum de 17 nm est en bon accord avec des valeurs typiques de volume exclu du aux queues des histones (Mangenot *et coll.* 2002; Muhlbacher *et coll.* 2006; Schiessel 2006). Dans tous les cas ce paramètre est *in fine* notre seul paramètre 'libre'.

Si l'on calcule pour ce modèle le facteur de structure avec les paramètres correspondant aux fibres de nucléosomes variants et de nucléosomes conventionnels, on obtient alors un très bon accord avec les courbes expérimentales (Figure 109). En effet, que ce soit pour 5, 9, 15 ou 32 répétitions dans le cas des chapelets conventionnels les courbes expérimentales et théoriques sont très proches. De même, dans le cas des nucléosomes variants on obtient des facteurs de structures très proches des mesures expérimentales que se soit pour 9 ou 32 répétitions (Figure 109). Ceci nous montre qu'un modèle de polymère dont les trois ingrédients sont la géométrie du nucléosome, le volume exclu entre NCPs et les paramètres dynamiques expérimentaux des mono-nucléosomes permet à la fois de rendre compte de l'organisation de la chromatine conventionnelle H2A et de celle de la chromatine variante H2A.Bbd.

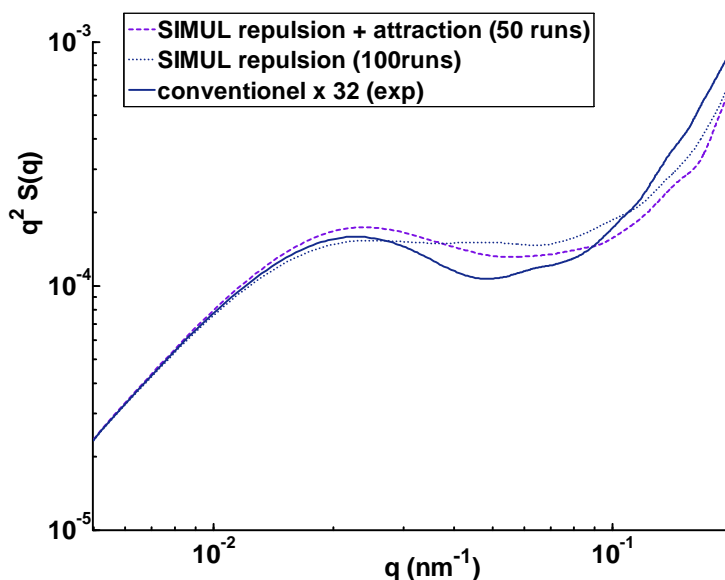


Figure 110: Prise en compte de l'attraction dans la simulation de fibres conventionnelles

Pour rendre compte en détail de la forme des facteurs de structures obtenus pour les fibres conventionnelles nous avons ajouté un terme d'attraction à notre potentiel effectif d'interaction entre nucléosomes. Pour ce faire nous avons favorisé les tirages positionnant le nucléosome suivant à 17 nm de son plus proche voisin. Ceci conduit à un facteur de structure (en pointillé mauve) présentant tout comme la courbe expérimentale (en bleu) un maximum local et une décroissance.

Pour aller plus loin, nous avons ajouté une interaction attractive entre nucléosomes voisins. En effet, comme nous l'avons vu les facteurs de structures expérimentaux des fibres de nucléosomes conventionnels comportent un maximum local autour de R_g et une région décroissante pour des valeurs comprises en R_g et la taille d'un NCP. Nous savons qu'un tel comportement correspond à la présence d'une échelle où la structure est compacte (Nakamura *et coll.* 2004), formant alors une fibre ou un globule. Pour améliorer notre simulation nous avons donc favorisé la distance premier voisin de 17 nm par rapport aux autres distances. Sans développer la technique utilisée, nous avons biaisé le tirage des nucléosomes successifs pour favoriser cette distance particulière. Si l'on fait le lien avec ce que nous avons postulé pour le volume exclu, tout ce passe donc comme si, dans cette simulation, les mono-nucléosomes s'auto-organisaient lors de la déposition à une distance de 17 nm les uns des autres. Pour l'expliquer, on peut proposer l'existence d'interactions stabilisantes entre les queues N-terminales des histones avec la surface des autres NCPs par exemple. En effet, des expériences d'ultracentrifugation suggèrent que la présence de la queue N-terminale de H4 est indispensable à la formation d'une fibre compacte en présence de $MgCl_2$ (Dorigo *et coll.* 2003; Zhou *et coll.* 2007). Néanmoins, on ne peut pas rejeter complètement d'autres phénomènes comme par exemple l'influence de la surface chargée. En ajoutant cette interaction à la simulation, le modèle reproduit le maximum local et permet de décrire parfaitement les courbes expérimentales (Figure 110).

En ce qui concerne les fibres variantes, l'ajout de cette interaction ne modifie pas les courbes obtenues (données non présentées). Tout se passe donc comme si, pour un système déjà très flexible (comme les fibres H2A.Bbd), le confinement à une distance donnée n'était pas efficace puisque le système fluctue trop. En conclusion, sans pouvoir être définitif, cette modification de la simulation nous permet de rendre compte des données et suggère la présence d'une interaction inter-nucléosomale qui stabiliserait la fibre compacte.

4.3.3 Effet de la flexibilité du nucléosome : chimère H2A.ddBbd

Cette étude nous a donc permis de montrer que les fibres d'histones variants sont à la fois plus flexibles et plus ouvertes et que l'on peut expliquer ce comportement en utilisant les paramètres dynamiques expérimentaux issus du mono-nucléosome variant H2A.Bbd, lui-même plus ouvert et plus flexible que le nucléosome conventionnel. Pour tester qui, de la flexibilité ou de l'ouverture des nucléosomes, est l'ingrédient le plus important, nous avons utilisé les nucléosomes chimères H2A.Bbd *docking domain* H2A (Bbd.ddH2A). Comme nous l'avons vu dans la section 3.4.3, les mono-nucléosomes formés à partir de cette chimère d'histones possèdent la même longueur complexée que le mono-nucléosome conventionnel H2A mais une dynamique proche de celle des mono-nucléosomes H2A.Bbd (voir section 3.4.3). Ces nucléosomes chimères sont donc intermédiaires pour les paramètres utilisés dans notre simulation : l'ouverture des nucléosomes H2A et la flexibilité des variants H2A.Bbd.

Nous avons donc reconstitué des fibres de nucléosomes chimère et des images AFM typiques de ces structures sont représentées sur la Figure 111. La saturation de ces fibres chimères est légèrement moins bonne que pour les autres types de fibres mais reste suffisante pour pouvoir effectuer la même analyse que celle faite précédemment. Nous remarquons le caractère ouvert des fibres chimères (Figure 111) qui, comme les fibres variantes H2A.Bbd, forment une structure en 'collier de perles'.

De manière plus quantitative, les différents paramètres structuraux, mesurés à l'échelle globale comme locale, montrent systématiquement un comportement similaire aux fibres variantes H2A.Bbd (voir Tableau 3). Nous avons pu comparer les facteurs de structure obtenus pour les fibres chimère Bbd.ddH2A avec ceux des fibres variantes et conventionnelles (Figure 112a). Comme on le voit le comportement de cette chimère est très proche des fibres variantes. De plus, en réutilisant les

paramètres du mono-nucléosome Bbd.ddH2A pour notre simulation numérique nous obtenons là encore un bon accord avec les données expérimentales (Figure 112b). Ceci confirme donc l'importance de la flexibilité pour la constitution d'une fibre compacte comparable à la fibre de 30 nm. Tout se passe donc comme si un chapelet trop flexible, même s'il possède la bonne structure à l'équilibre, ne formait pas de fibre compacte du fait du trop grand nombre de degrés de liberté du système. En effet, des fluctuations trop importantes pourraient l'empêcher de ressentir les interactions attractives avec ses voisins.

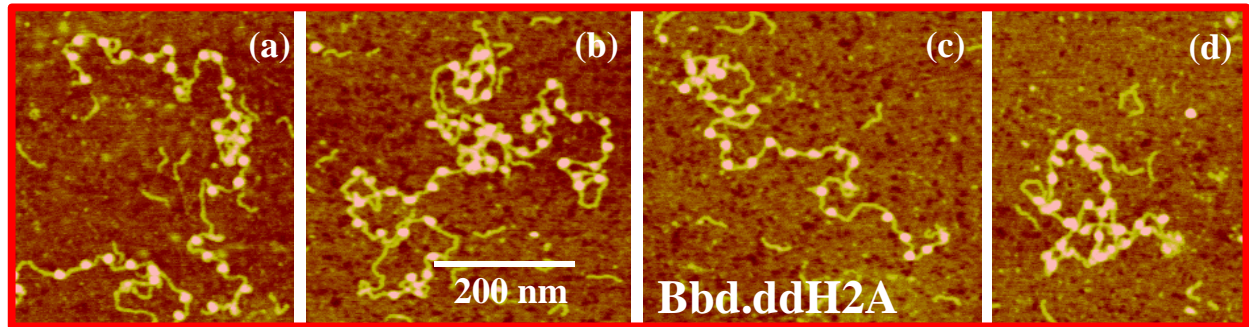


Figure 111 : Exemples de chromatines chimères

Images AFM de topographie de fibres nucléosomales chimères Bbd.ddH2A reconstituées sur un substrat ADN formé de 32 répétitions de séquences positionnantes 601. On remarque le caractère ouvert des fibres chimères qui, tout comme les fibres variantes H2A.Bbd, forment une structure en 'collier de perles'.

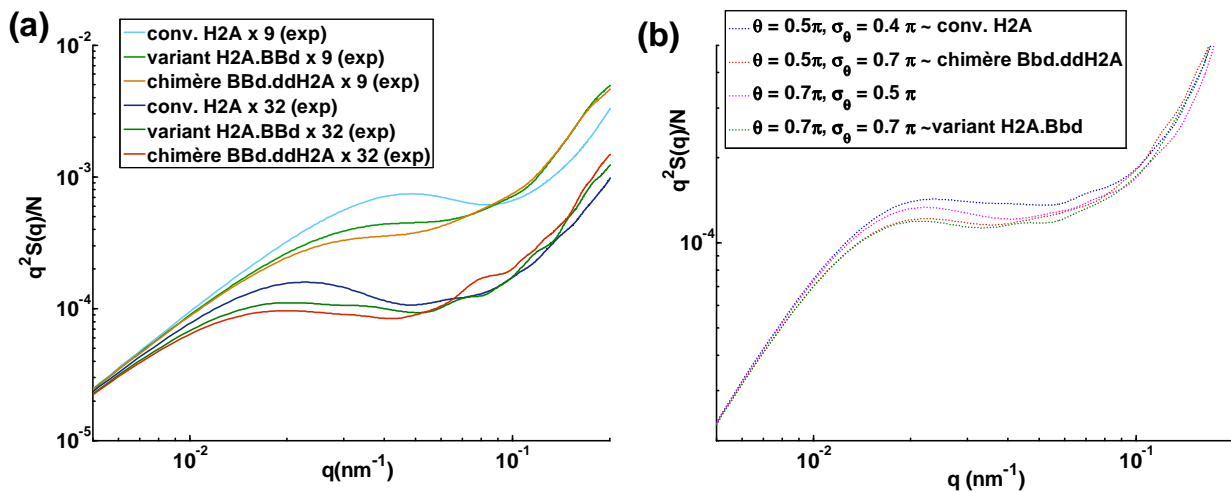


Figure 112 : Effet de la flexibilité sur les kratky-plots expérimentaux et simulés

(a) Kratky-plots expérimentaux des 3 types de fibres avec 9 et 32 répétitions: conventionnelles H2A, variantes H2A.Bbd et chimères Bbd.ddH2A. On remarque que le facteur de structure des fibres chimères Bbd.ddH2A est très proche de celui des fibres variantes H2A.Bbd

(b) Kratky-plots simulés pour plusieurs combinaisons des deux paramètres (issus des données sur les mono-nucléosomes) que sont l'angle d'ouverture (θ) et la flexibilité de cet angle (σ_θ). Comme pour les kratky-plots expérimentaux, on remarque que la simulation d'une fibre chimère (en rouge) donne un facteur de structure très similaire à celui des fibres variantes H2A.Bbd (en vert), suggérant que le paramètre σ_θ est l'ingrédient principal dans notre modèle.

Essayons maintenant de comparer nos résultats à ceux obtenus par Tremethick *et coll.* (Zhou *et coll.* 2007). En mutant des acides aminés de l'histone H2A.Bbd pour reformer le patch acide de l'histone H2A à la surface du nucléosome H2A.Bbd, les auteurs ont montré que ce patch acide était nécessaire pour compacter une fibre variante mais insuffisant pour atteindre le niveau de compaction d'une fibre conventionnelle en l'absence de magnésium. Ils concluent que l'interaction

du patch acide sur la surface de H2A avec la queue de l'histone H4 rend la chromatine capable de se replier pour former une fibre compacte. Dans le cadre de notre modèle mécanique, les différences de compaction des 3 types de fibres analysées, trouvent leur origine au niveau de la flexibilité des nucléosomes à l'échelle individuelle. Au regard des résultats de Tremethick *et coll.*, un bon candidat pour expliquer la flexibilité accrue du nucléosome H2A.Bbd est la perte d'interaction des queues d'histones H4 avec la surface du nucléosome. Ainsi, notre modèle mécanique d'organisation de la chromatine permet de faire le lien entre l'origine microscopique de cette augmentation de flexibilité et l'incapacité à former une fibre compacte.

4.4 Conclusions sur l'étude des chapelets de nucléosomes à l'équilibre

Pour conclure nous avons donc montré qu'en utilisant la microscopie à force atomique combinée avec une analyse d'image automatisée nous sommes capables de différencier des fibres conventionnelles et variantes. En outre, l'investigation de l'organisation de ces fibres à différentes échelles montre le rôle prépondérant de la structure et de la dynamique du mono-nucléosome. Pour finir, l'étude de nucléosomes chimères montre quant à elle le rôle fondamental de la flexibilité du nucléosome dans la constitution d'une fibre compacte de nucléosome (Figure 113). Cette étude confirme donc le rôle prépondérant des variants d'histones dans l'accessibilité de l'ADN chromatinien.

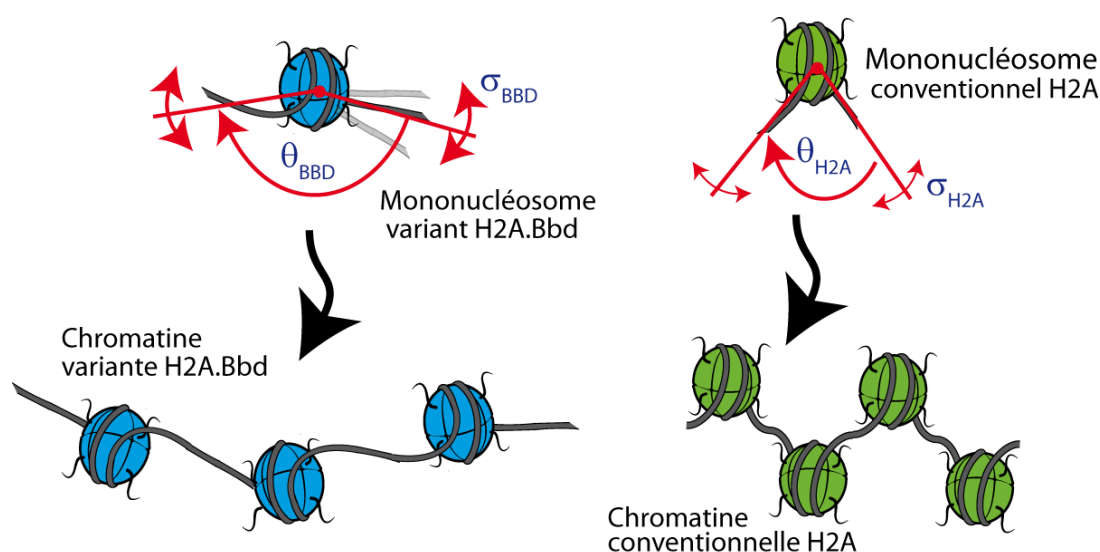


Figure 113 : Les paramètres dynamiques et structuraux du nucléosome influence les degrés supérieurs d'organisation de la fibre de chromatine.

A l'échelle du mono-nucléosome, deux paramètres effectifs permettent de distinguer la structure et la dynamique des nucléosomes variants H2A.Bbd et conventionnels H2A : l'angle d'ouverture θ et la dynamique des fluctuations de cet angle σ_θ . A l'échelle de la fibre nucléosomale, ces différences conduisent à deux types de structure : relâchée de type 'collier de perles' pour la fibre variante H2A.Bbd et compacte de type 'fibre de 30 nm' pour la fibre conventionnelle H2A. Nous avons montré que la flexibilité à l'échelle du mono-nucléosome est l'ingrédient qui influence le plus les degrés supérieurs d'organisation de la fibre de chromatine.

Dans le cas précis de H2A.Bbd on peut comprendre la nécessité de former une fibre relâchée par sa présence dans les zones actives de la chromatine, susceptible d'être transcrite fréquemment mais surtout par sa fonction lors de la spermatogenèse à un stade où tous les histones doivent être

remplacées par les protamines. En remplaçant uniquement deux histones du nucléosome la machinerie cellulaire est donc susceptible de rendre très ouverte la chromatine en vue du remplacement de ces mêmes nucléosomes par les protamines qui vont ensuite, à l'opposé, condenser très fortement l'ADN nucléaire.

Plus généralement ces résultats suggèrent que les phénomènes susceptibles de modifier la dynamique du nucléosome (comme la fixation d'un facteur de transcription, le remodelage de la chromatine, la modification post-traductionnelle des histones) sont potentiellement capables de modifier la structuration de la fibre à une échelle supérieure. Ils mettent donc en avant le rôle fondamental de la dynamique dans la construction de ce niveau d'organisation. Il serait donc intéressant d'étendre cette démarche à des systèmes modifiant la dynamique du nucléosome comme la plupart des facteurs capables de se lier à l'ADN chromatinien. On peut penser par exemple que la liaison d'un facteur de transcription serait capable de défaire localement la structure compacte de la fibre.

Enfin, il serait intéressant de voir comment un défaut de flexibilité (induit par la présence d'un nucléosome variant au milieu d'un chapelet de nucléosomes conventionnels par exemple) serait capable de se propager à d'autres nucléosomes pour donner lieu à une ouverture localisée de la chromatine.

5 Hors-équilibre : Les mono-nucléosomes

Dans cette partie nous nous intéressons aux mécanismes d'action des facteurs de remodelage de la sous-famille 'swi2/snf2 like' que sont SWI/SNF et RSC (section 1.2.2). Les questions posées au départ de cette étude étaient : peut-on observer par AFM les états intermédiaires du phénomène de remodelage ? Quel est la processivité et la directionnalité de ce mouvement ? Peut-on suivre le retour vers l'équilibre des nucléosomes remodelés ? Nous verrons qu'en combinant nos données à des données biochimiques nous avons pu établir un modèle cinétique décrivant l'action de ce type de moteur moléculaire de la chromatine.

Comme nous l'avons vu dans l'introduction, les facteurs de la famille de la famille SWI/SNF sont connus pour déplacer un nucléosome positionné au centre d'un fragment d'ADN vers une des extrémités de manière ATP dépendante (Hamiche *et coll.* 1999; Whitehouse *et coll.* 1999). Du point de vue physique, on peut voir ce processus comme un pompage hors équilibre à partir de l'état fondamental vers un état excité métastable (correspondant à l'extrémité du fragment d'ADN). La première question posée est donc : quel chemin réactionnel permet de passer du fondamental à l'état excité et existe-t-il des états intermédiaires discernables ?

Ces expériences ont été réalisées en collaboration avec Dimitar Angelov et ses étudiants.

5.1 Mono-nucléosomes non marqués

5.1.1 SWI/SNF et mono-nucléosomes courts positionnés

5.1.1.1 Principe de l'expérience et visualisation

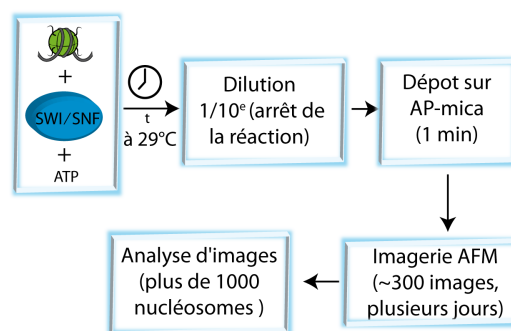


Figure 114 : Protocole de l'expérience de remodelage

L'expérience consiste à faire réagir à 29°C pendant un temps déterminé les nucléosomes positionnés avec SWI/SNF et l'ATP. On arrête la réaction en diluant le mélange et en déposant sur la surface AP-mica, puis l'échantillon est visualisé par AFM pour acquérir ~300 d'images qui sont ensuite analysées automatiquement.

Pour répondre à cette première question nous utilisons les même cartes 2D $L_c/\Delta L$ que pour l'étude à l'équilibre (section 3.1.1) dans le but de découpler les changements de position du nucléosome, d'éventuelles réorganisations de l'ADN enroulé qui conduiraient à une modification de la distribution de longueur complexée.

L'expérience consiste à faire réagir à 29°C, pendant un temps déterminé, les nucléosomes positionnés avec SWI/SNF + ATP puis à arrêter la réaction en diluant le mélange et en déposant sur la surface AP-mica (Figure 114). Cette méthode nous permet de capturer, pour une population de nucléosomes, des instantanés de la réaction à différents points de temps, avec une résolution temporelle donnée par le temps de dilution et de dépôt, c'est à dire de l'ordre de la minute.

Nous obtiendrons donc l'évolution au cours du temps des distributions de L_c , ΔL et $L_c/\Delta L$ pour une population de nucléosomes et non pas l'évolution de L_c et ΔL pour un nucléosome donné. A noter que notre méthode ne nous permet pas d'étudier les nucléosomes complexés avec le moteur, car la masse moléculaire du complexe SWI/SNF étant 10 fois supérieure à celle du nucléosome, nous ne pouvons plus mesurer la position du nucléosome sur l'image AFM lorsque le complexe est présent (ni même nous assurer qu'un nucléosome est présent sous le complexe de remodelage). C'est pourquoi, dans toute la suite de ce travail, nous écarterons de l'analyse les mono-nucléosomes (ou oligo-nucléosomes) liés à un facteur de remodelage. Par conséquent, nous ne pourrions pas tester ce qui se passe avant le décrochage du moteur (pauses, pas du moteur, etc ...) mais seulement le résultat de l'action de l'enzyme sur son substrat ou les intermédiaires réactionnels stables après son action.

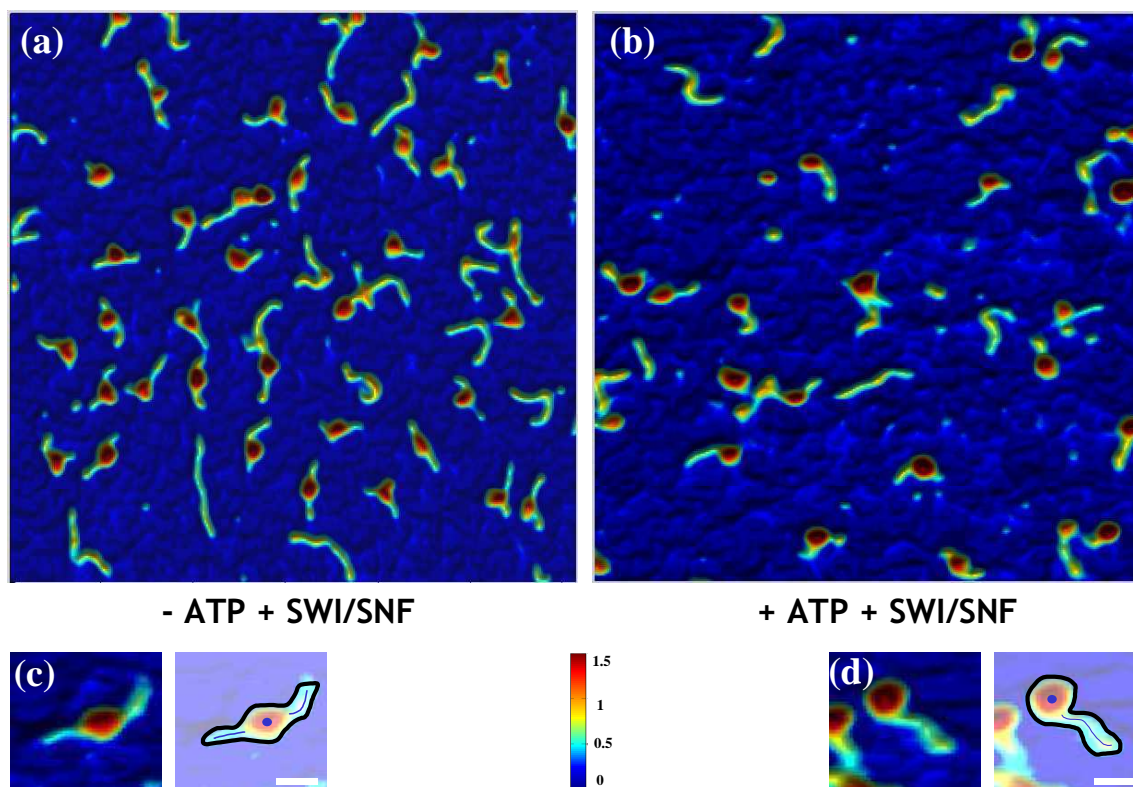


Figure 115 : Images AFM des nucléosomes avant et après réaction avec SWI/SNF

Images 1x1 µm de topographie AFM de mono-nucléosomes reconstitués sur une séquence positionnante 601 centrée sur un fragment d'ADN de 255 pb. Echelle Z : de 0 (bleu) à 1.5 nm (rouge). Les nucléosomes ont été incubés pendant 1h avec le facteur de remodelage SWI/SNF (a) en l'absence et (b) en présence d'ATP. Zoom des images de topographie AFM d'un nucléosome (c) centré et (d) en position extrême ainsi que le résultat de l'analyse d'image (ligne noire : contour du nucléosome, point bleu : centroïde de la particule de cœur du nucléosome, ligne bleue : squelette des bras d'ADN). Barre d'échelle : 20 nm.

Nous réalisons cette expérience pour des nucléosomes positionnés par la séquence 601 placée à 52 pb d'un bord et 56 pb de l'autre bord. L'échantillon ne contenant pas d'ATP est l'expérience de contrôle qui permet de prendre en compte un effet éventuel de diffusion thermique du nucléosome induit par la température (1h à 29°C). Les images AFM représentatives de la Figure 115 montrent clairement que les nucléosomes sont centrés sur le fragment d'ADN pour le contrôle - ATP tandis qu'ils occupent une position à l'extrémité du fragment d'ADN en présence de SWI/SNF et d'ATP.

5.1.1.2 Cartes $L_c/\Delta L$ du glissement par SWI/SNF

Puis nous construisons les cartes $L_c/\Delta L$ correspondant aux trois temps : 0, 20 minutes et une heure (Figure 116) (l'origine des temps est donné par le contrôle en l'absence d'ATP). Pour le contrôle - ATP, la carte est identique à celle obtenue dans le cas où le moteur est absent confirmant l'impression visuelle des images AFM (Figure 115). Pour cette condition, on observe un seul état dont le maximum de probabilité est $L_c = 147$ pb et $\Delta L \sim 10$ pb, qui correspond bien à l'état (α). Pour $t = 20$ min on observe une déformation de l'état initial au profit des longueurs complexées plus grandes (L_c allant jusqu'à ~ 180 pb). Pour $t = 60$ min, on retrouve les nucléosomes sur-complexés ($L_c \sim 180$ pb), que nous nommerons état (β), qui sont alors isolés et plus nombreux. Cet état correspond à des nucléosomes dont la dyade est à la même position que l'état initial mais comportant environ 30 pb d'ADN supplémentaire.

Pour $t = 60$ min, on observe également l'apparition d'états glissés au bout du fragment ($\Delta L \sim 50$ pb) que nous appellerons états (δ), qui possèdent une longueur complexée légèrement inférieure (~ 130 pb). Enfin, on observe l'apparition en faible quantité d'un état altéré comportant ~ 70 pb d'ADN complexée que nous interprétons comme le résultat de l'éviction d'un ou deux dimères (H2A-H2B) du nucléosomes par SWI/SNF et que nous appellerons état (tétrasome). Cette cinétique montre donc l'apparition de deux états majeurs distincts : tout d'abord un état non déplacé mais sur-complexé (β) et ensuite un état légèrement sous complexée et glissé (δ) apparaissant à la suite de l'état (β).

La distance $\Delta(\Delta L)$ séparant les états (α) et (δ) est proche de la distance $\Delta(L_c)$ entre les états (β) et (α), ce qui signifie que l'état glissé (δ) est vraisemblablement le résultat du relâchement de la sur-complexation d'ADN de l'état (β). Le fait que les nucléosomes glissés (état δ) soient légèrement sous-complexés, c'est-à-dire que leur dyade ait été déplacée plus loin que la position extrême attendue pour une particule de cœur de 147 pb, a déjà été observé dans des études biochimiques précédentes (Kassabov *et coll.* 2003).

L'état (tétrasome) est un état fortement sous-complexé ($L_c \sim 70$ pb) qui pourrait résulter de la perte d'un tour d'ADN enroulé autour de l'octamère d'histones d'un nucléosome soit dans l'état (α) soit dans l'état (δ). Néanmoins, on peut remarquer que cet état (tétrasome) est absent de la carte "+ATP, 20 min" (Figure 116b) où peu de nucléosomes ont été glissés par SWI/SNF (faible intensité de l'état (δ)), ce qui suggère que cet état (tétrasome) est plutôt le résultat de la perte d'un tour d'ADN d'un nucléosome positionné à l'extrémité du fragment d'ADN (état (tétrasome)).

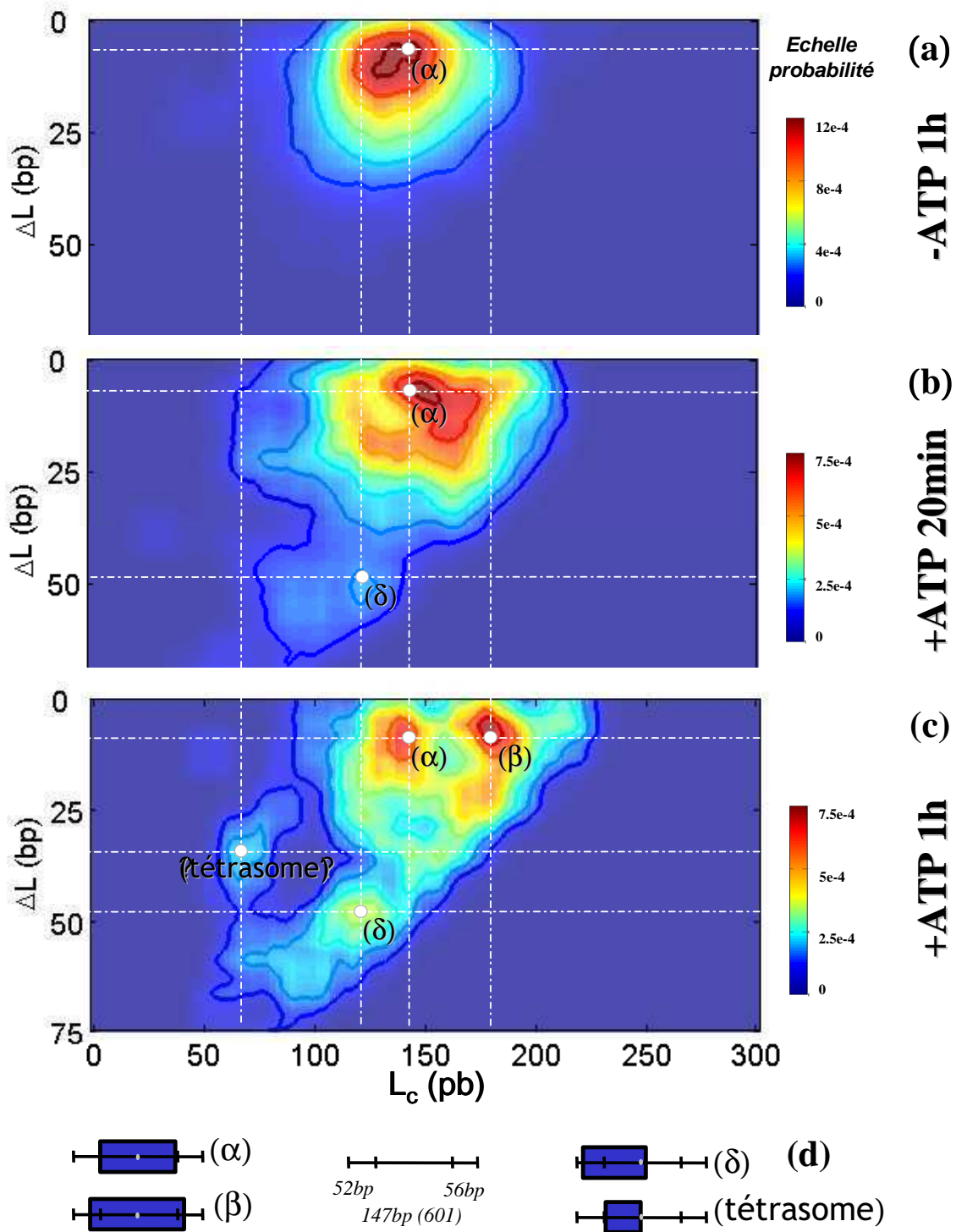


Figure 116 : Evolution cartes $L_c/\Delta L$ lors du remodelage par SWI/SNF

Evolution de l'histogramme 2D $L_c/\Delta L$ représentant la longueur d'ADN complexé et la position des nucléosomes au cours du remodelage par le complexe SWI/SNF (a) sans ATP (1 h à 29°C) (b) avec ATP (20 min à 29°C) et (c) avec ATP (1 h à 29°C). (d) Représentation des paramètres $L_c/\Delta L$ des nucléosomes pour les états (α), (β), (δ), et (tétrosome), définis sur les cartes 2D. $N(-\text{ATP}, 1 \text{ h à } 29^\circ\text{C}) = 692$ nucléosomes, $N(+\text{ATP}, 20 \text{ min à } 29^\circ\text{C}) = 245$ nucléosomes, $N(+\text{ATP}, 1 \text{ h à } 29^\circ\text{C}) = 655$ nucléosomes.

Si l'on projette ces cartes sur les axes L_c et ΔL on retrouve le phénomène de glissement. La projection sur ΔL montre que l'état (α) ($\Delta L \sim 10$ pb) disparaît au profit de l'état (γ) ($\Delta L \sim 50$ pb)

(Figure 117). En outre, la densité d'états ayant une position intermédiaire ($\Delta L \sim 30\text{pb}$) ne varie pas. Tout se passe donc comme si les nucléosomes passaient directement de la position 10 pb à la position 50 pb sans que nous n'observions d'état glissé intermédiaire. En ce qui concerne la projection sur L_c on observe un élargissement de la distribution au cours du temps qui corrobore l'apparition d'un état sur-complexé.

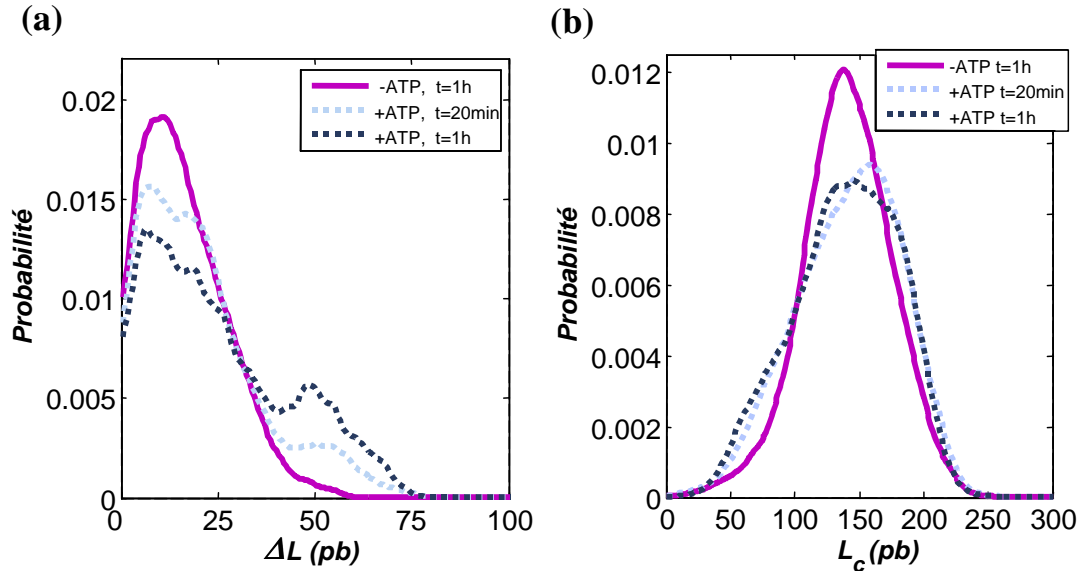


Figure 117 : Projection des cartes $L_c/\Delta L$ obtenues lors du remodelage par SWI/SNF

Evolution des distributions de (a) position ΔL et (b) longueur complexée L_c du nucléosome en fonction du temps (0, 20 min, 1 h) en présence de SWI/SNF pour des mono-nucléosomes courts (255 pb). L'origine des temps est donné par le contrôle en l'absence d'ATP (trait plein rose). Pour les distributions de position en (a) seuls les mono-nucléosomes ayant une longueur complexée dans la gamme $L_c^* \pm \sigma_{L_c}$ sont pris en compte.

5.1.1.3 Discussion préliminaire

La mise en évidence de l'état (β) intermédiaire est facilité par la représentation 2D $L_c/\Delta L$. En effet, comme l'état (β) a la même position que l'état (α), on voit bien que l'information de position seule ne nous aurait pas permis de l'observer.

Comment interpréter à ce stade la présence de cet état sur-complexé ? Du fait qu'il apparaît en amont de l'état glissé et qu'il n'est pas déplacé, on peut penser à une étape intermédiaire de la réaction. Cette étape correspondrait à une étape de remodelage du nucléosome précédant l'étape de glissement. Comme nous avons observé que ΔL ne change pas, cela suggère que le moteur serait susceptible de pomper de chaque côté du nucléosomes ~ 15 pb d'ADN supplémentaire. On peut relier la présence de cette sur-complexation au modèle de boucle (Kulic *et coll.* 2003) présenté dans l'introduction (section 1.3.3.1). Néanmoins, dans ce modèle théorique, le défaut de boucle est créé à une des entrées du nucléosome, puis propagée vers la sortie. Dans notre cas, le fait que l'ADN soit pompé de chaque bras du nucléosome et que la sur-complexation soit stable après le départ du moteur correspondrait à une modification de ce modèle. De plus, la résolution de notre imagerie AFM ne nous permet pas de visualiser la réorganisation de l'ADN dans ce nucléosome remodelé, ce qui limite notre interprétation au niveau microscopique de l'état (β). Enfin, si c'est bien un état intermédiaire, il devrait disparaître pour des temps supérieurs à 60 min en se transformant progressivement en état (δ).

Comment comprendre l'absence d'état glissé à des positions intermédiaires ? On peut proposer deux hypothèses : soit la processivité du complexe nucléosome+moteur est grande devant

la longueur des bras libres du nucléosome et de ce fait, les pas élémentaires ou des pauses dans le déplacement seraient réalisés lorsque le moteur reste en contact avec le nucléosome ; soit le pas élémentaire est environ $\sim 40/50$ pb et l'ADN supplémentaire présent dans l'état (β) serait relâché en bloc pour effectuer ce déplacement, nous ne pourrions alors voir qu'un seul pas avec cette construction nucléosomale.

5.1.2 RSC et mono-nucléosomes positionnés

Pour tester les hypothèses précédentes, nous avons ensuite utilisé un fragment d'ADN plus long et plus asymétrique dans lequel la séquence 601 est encadrée de 82 pb d'un côté et de 127 pb de l'autre. On peut donc espérer que si le pas est bien ~ 40 pb et que le moteur se détache après chaque pas, nous observerons des arrêts pour la position correspondante. Pour des raisons techniques (grande affinité de SWI/SNF pour le nucléosome qui limite fortement le nombre de nucléosomes libres sur l'image) nous avons choisi de conduire cette expérience avec un autre moteur, RSC, dont la sous-unité ATPase Sth1 est très proche du point de vue l'homologie de séquence et qui est connu pour avoir un comportement similaire avec des nucléosomes centrés (Lorch *et coll.* 1998).

Nous avons alors réalisé trois types d'expériences : une cinétique à [ATP] et [RSC] constantes, une titration de RSC à temps d'incubation et [ATP] constants et enfin une titration de l'ATP à temps d'incubation et [RSC] constants (Figure 119 Figure 121). Ces expériences sont comme précédemment des instantanés obtenus en bloquant la réaction par dilution et déposition des nucléosomes et a nécessité l'analyse de plus de 30 000 nucléosomes. Dans un premier temps nous essayerons de dégager les informations principales que nous apportent ces données obtenues en fonction des 3 paramètres de notre expérience que sont le temps, le ratio nombre de moteur / nombre de nucléosomes et la concentration en ATP. Puis nous tenterons d'analyser quantitativement la cinétique de la réaction de remodelage.

5.1.2.1 Les états du nucléosome observés au cours du remodelage par RSC

Intéressons nous tout d'abord à la carte de la Figure 118 présentant une condition intermédiaire du glissement du nucléosome par RSC et pour laquelle tous les états du nucléosome que nous avons pu visualiser au cours du remodelage sont présents. Nous avons illustré ces états par des images AFM représentatives. On retrouve les états décrits précédemment pour SWI/SNF (sur les nucléosomes courts) : l'état initial α ($L_c = 147$ pb, $\Delta L = 20$ pb), l'état sur-complexé β ($L_c \sim 210$ pb, $\Delta L \sim 10$ pb) et l'état glissé au bout du fragment δ ($L_c \sim 135$ pb, $\Delta L \sim 110$ pb) et l'état 'faux-un-bras'.

Jusqu'à présent, nous n'avons pas tenu compte dans nos analyses des nucléosomes 'faux-1-bras' (c'est à dire des nucléosomes n'ayant qu'un bras apparent, les deux bras étant superposés sur la surface, voir section 3.1.2). Ce choix ne modifie pas les résultats obtenus pour SWI/SNF et les mono-nucléosomes car il revient simplement à sous-estimer la proportion des états (α) et (β). Puisque nous souhaitons à présent faire une mesure quantitative de la proportion de nucléosomes dans chaque état, nous allons les prendre en compte et les discuter plus en détails.

Si on regarde de plus près la Figure 118, on s'aperçoit que la tache correspondant aux états (faux-1-bras) est double : elle est en réalité constitué de deux types d'événements : des états (α) avec un bras caché et des états (β) avec un bras caché. En effet, $L_c(\alpha\text{-faux-1-bras}) = 235$ pb $\sim L_c(\alpha) + L-(\alpha)$ pb = $147 + 82 = 229$ pb et $\Delta L(\alpha\text{-faux-1-bras}) = 60$ pb $\sim \Delta L(\alpha) + 0.5 \cdot L-(\alpha) = 20 + 41 = 61$ pb. De la même façon on peut relier la position de (β -faux-1-bras) à celle de l'état (β). Notons que la proportion relative de l'état (α -faux-1-bras) est faible par rapport à l'état (α) mais qu'elle est du

même ordre pour les états (β -faux-1-bras) et (β). Ceci peut être relié à une labilité accrue du nucléosome remodelé (β) par rapport au nucléosome canonique (α).

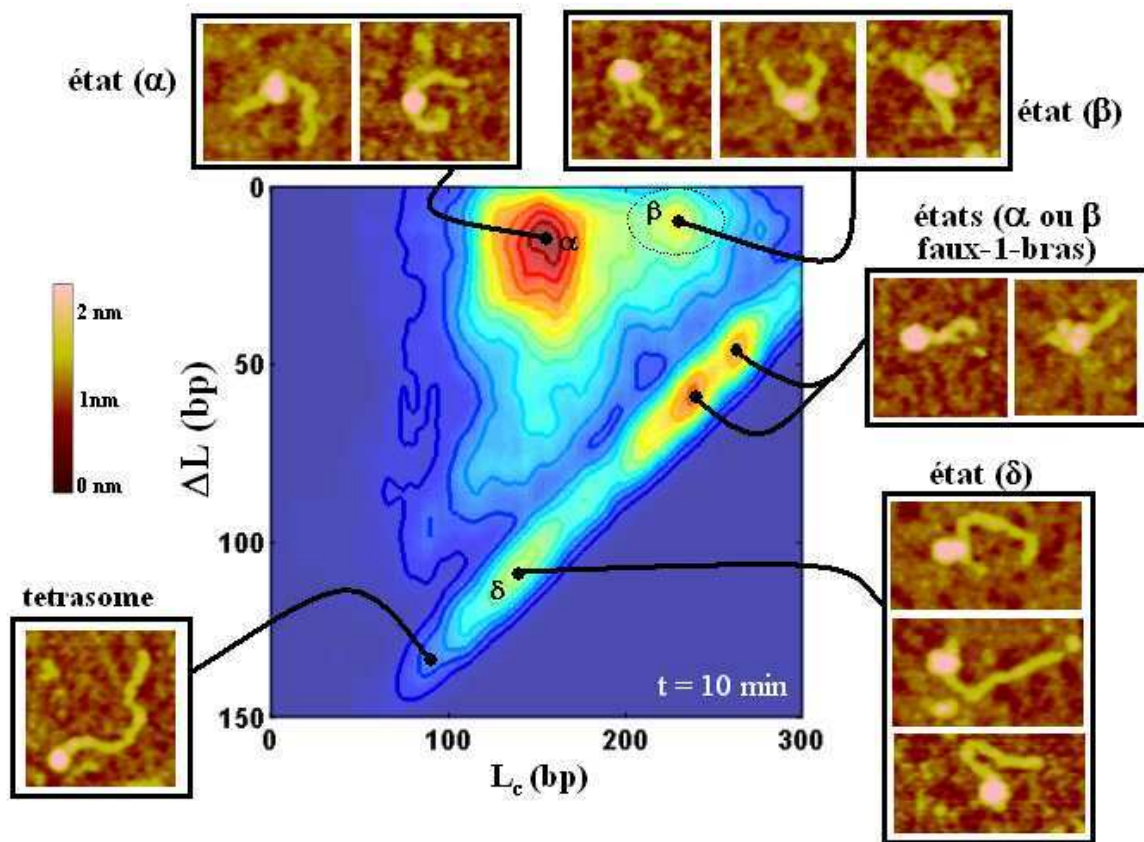


Figure 118 : Carte $L_c/\Delta L$ obtenue lors du remodelage par RSC

Exemple de carte $L_c/\Delta L$ correspondant à un temps intermédiaire (10 minutes) du glissement du mono-nucléosome long 127-601-82 par RSC et pour laquelle tous les états du nucléosome sont présents. Chaque état est illustré par quelques images AFM représentatives. Le nombre total de nucléosomes analysés pour cette carte est ~ 2000 .

Nous voyons sur les différentes cinétiques (Figure 119 à Figure 121) que la quantité de ces états (faux-1-bras) évolue au cours de la réaction de remodelage. Dans les analyses quantitatives que nous effectuerons par la suite, nous essayerons, autant que possible, de prendre en compte séparément les états (α -faux-1-bras) et (β -faux-1-bras).

5.1.2.2 Cinétiques et titrations de la réaction de remodelage par RSC

Dans un deuxième temps, essayons de voir qualitativement les tendances qui se dégagent des différentes évolutions présentées sur les Figure 119 à Figure 121.

Nous remarquons des caractéristiques communes aux trois cinétiques :

- pour les faibles [ATP], [RSC] et temps de réaction, l'état majoritaire est l'état (α).
- puis on voit apparaître l'état (β)
- lorsque celui-ci disparaît, on remarque alors l'apparition de l'état (δ) qui devient alors majoritaire.

De plus, nous n'observons pas de d'états glissés intermédiaires à la position (γ), qui correspondrait à la position de l'état (δ) observé pour les nucléosomes courts, c'est à dire à ~ 50 pb de l'état initial.

Dans le cas des mono-nucléosomes longs remodelés par RSC, on remarque que l'état (β) présente une sur-complexation supérieure ($L_c \sim 200$ pb contre 180 pb pour les mono-nucléosomes courts remodelés par SWI/SNF). Cette différence peut provenir soit de la longueur des bras d'ADN libre, soit du moteur de remodelage utilisé. Pour le tester, il conviendrait donc de refaire ces mêmes expériences en échangeant les 2 moteurs.

De plus, s'il est attendu de vérifier que l'apparition de l'état (δ) est bien dépendant de RSC et de l'ATP, il est intéressant de remarquer qu'il en est de même pour l'état (β). Ceci suggère que la formation de l'état (β) est bien due au facteur de remodelage par une action ATP-dépendante. Ces résultats confirment donc dans le cas de RSC que d'une part, l'état (β) est bien un état intermédiaire de la réaction, que l'état (δ) est le produit final et d'autre part qu'il n'existe pas d'autres états intermédiaires de glissement dans lequel le moteur est détaché du nucléosome.

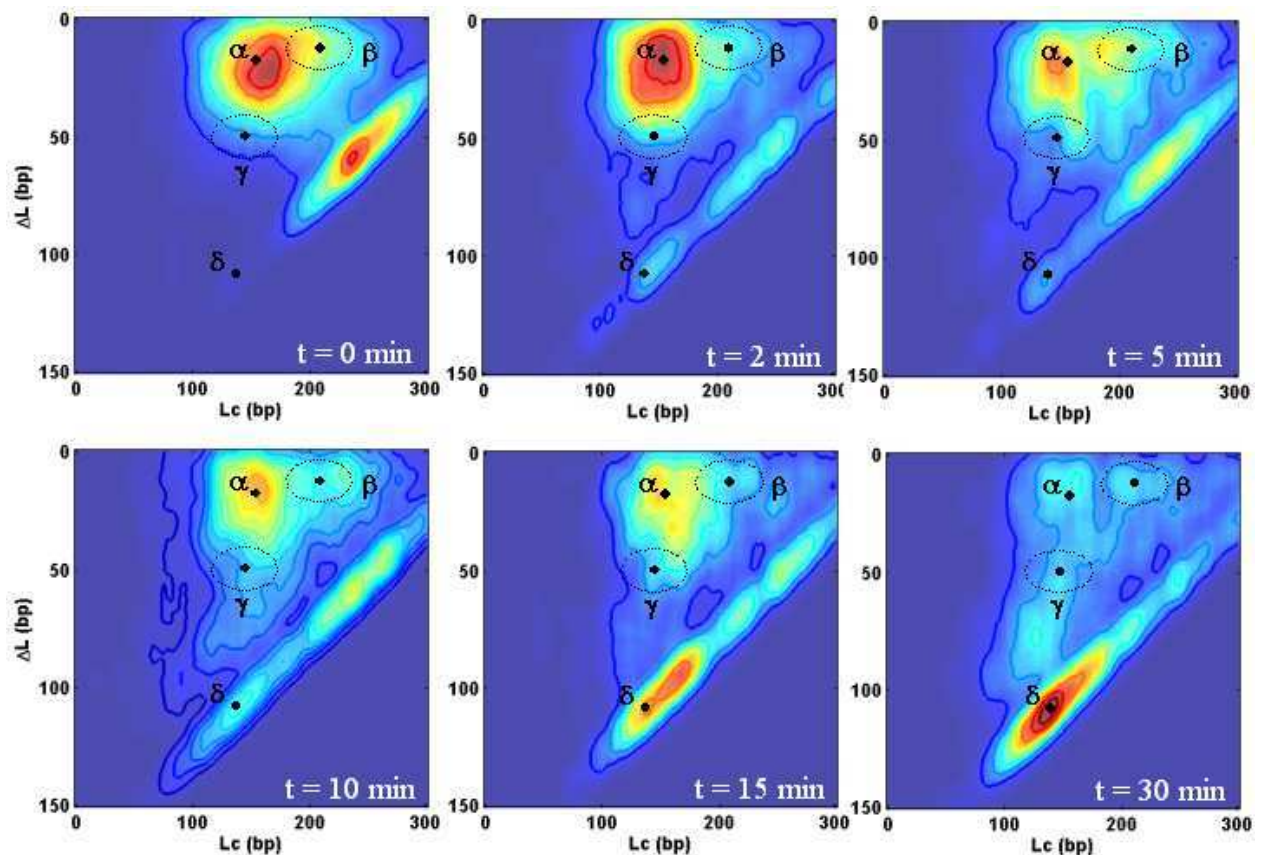


Figure 119 : Evolution des cartes $L_c/\Delta L$ lors de la réaction de remodelage par RSC en fonction du temps

Pour des concentrations en RSC et en ATP constantes $[RSC] = 1.75 \mu l$ et $[ATP] = 1$ mM. Toutes les cartes sont représentées pour une même échelle de couleur correspondant à une même échelle de probabilité.

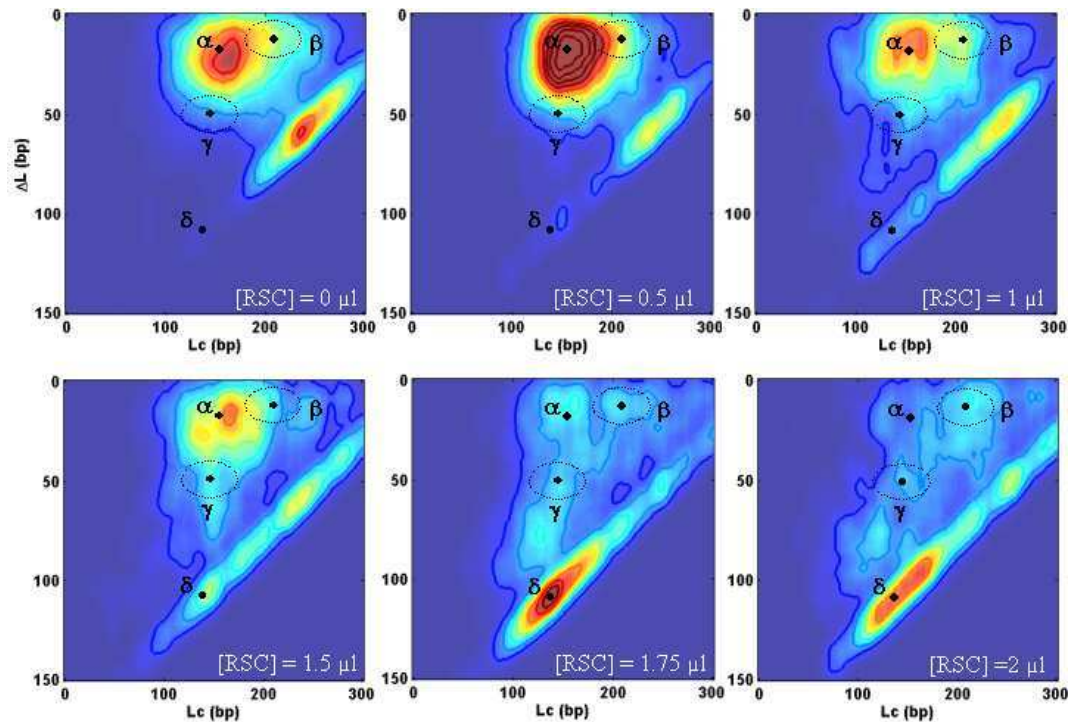


Figure 120 : Evolution des cartes $L_c/\Delta L$ lors de la réaction de remodelage par RSC en fonction du ratio RSC/nucléosomes

Pour un temps d'incubation constant $t = 30$ min et une concentration en ATP constante $[ATP] = 1$ mM et une concentration en nucléosomes constante. Toutes les cartes sont représentées pour une même échelle de couleur correspondant à une même échelle de probabilité.

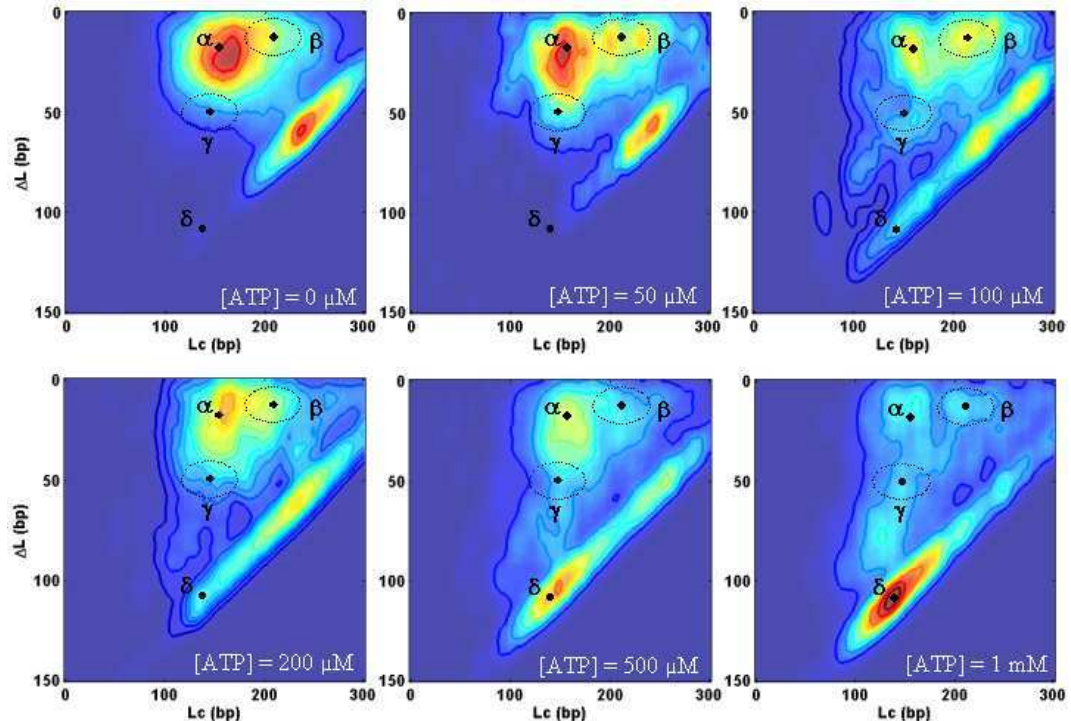


Figure 121 : Evolution des cartes $L_c/\Delta L$ lors de la réaction de remodelage par RSC en fonction de la concentration en ATP

Pour un temps d'incubation constant $t = 30$ min et une concentration en RSC constante $[RSC] = 1.75$ μ l. Toutes les cartes sont représentées pour une même échelle de couleur correspondant à une même échelle de probabilité.

Si l'on projète maintenant les cartes en fonction du temps (Figure 119) sur l'axe des positions, on observe comme précédemment une disparition de l'état (α) au profit de l'état (δ) sans apparition d'un état intermédiaire défini.

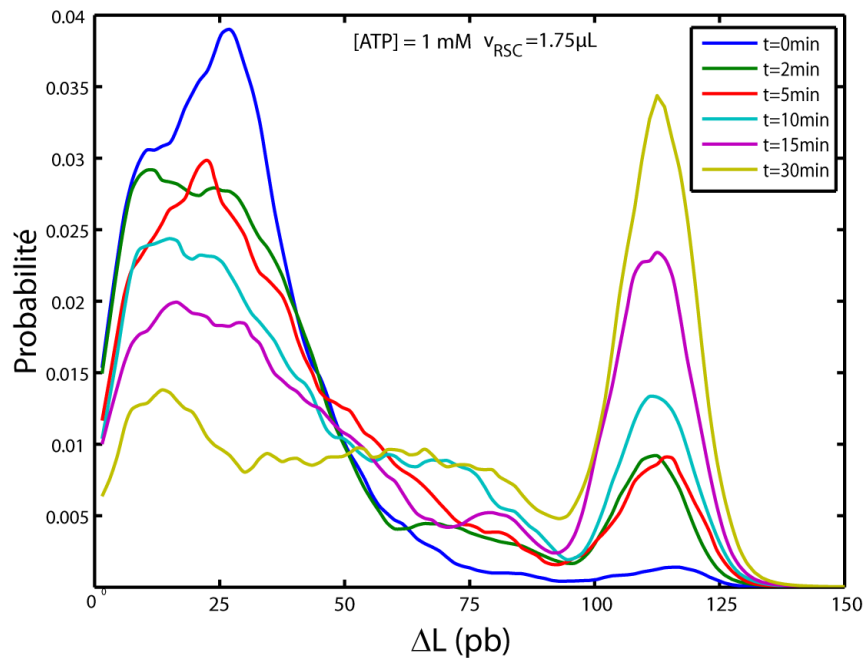


Figure 122 : Projection des cartes $L_c/\Delta L$ sur l'axe des positions pour l'action de remodelage par RSC en fonction du temps

Les cartes $L_c/\Delta L$ obtenues lors de la cinétique de remodelage par RSC (Figure 119) ont été projetées sur l'axe des positions ΔL pour les nucléosomes ayant une longueur d'ADN complexée appartenant à l'intervalle $130 < L_c < 160$ pb. On observe le 'transfert' des nucléosomes de l'état (α) ($\Delta L \sim 20$ pb) vers l'état (δ) ($\Delta L \sim 110$ pb).

Cependant, nous voyons qu'avec ce type de projection, nous sommes limités dans l'analyse aux états (α) et (δ). Si nous voulons tenir compte de l'état (β) il nous faut considérer la carte $L_c/\Delta L$ complète, ce que nous allons faire maintenant.

5.1.2.3 Segmentation et quantification de la cinétique

Nous avons ensuite réalisé une segmentation des cartes pour extraire l'évolution de chacun des états ($\alpha + \alpha$ -faux1bras), ($\beta + \beta$ -faux1bras) et (δ). Pour ce faire nous avons construit pour chaque état une zone de présence sur la carte représentée dans la Figure 123. La proportion de l'état i correspond dans ce cas à l'intégrale de la distribution 2D $L_c/\Delta L$ sur la zone de présence i rapportée au nombre de nucléosomes présents dans toutes les zones définies.

On remarque sur la Figure 123 que l'état ($\alpha + \alpha$ -faux1bras) décroît exponentiellement tout au long de la cinétique. En outre, l'état ($\beta + \beta$ -faux1bras) augmente rapidement puis décroît à partir de $t = 10$ minutes. L'état (δ) quant à lui augmente jusqu'à représenter la majorité des évènements. Ces évolutions confirment donc notre hypothèse postulant que l'état (β) est un intermédiaire réactionnel de la réaction de glissement par RSC.

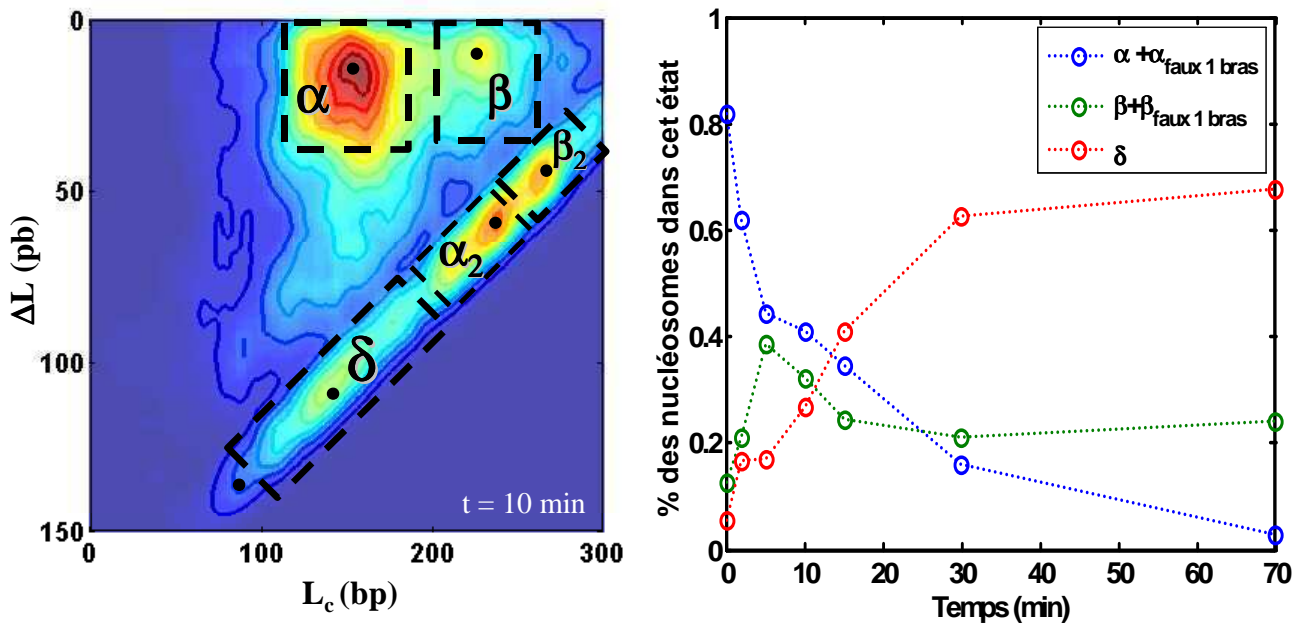


Figure 123 : Segmentation des cartes $L_c/\Delta L$ et quantification des états au cours de la cinétique de glissement par RSC

Nous avons découpé la carte en cinq zones distinctes correspondant aux cinq états que nous avons décrits pour le nucléosome ($\alpha, \alpha_2 = \alpha$ -faux1bras, β , $\beta_2 = \beta$ -faux1bras, δ). Nous avons alors intégré les cartes $L_c/\Delta L$ obtenues lors de la cinétique à $[ATP] = 1\text{mM}$ et $v_{RSC} = 1.75 \mu\text{L}$ sur chacune des zones ainsi définies. Nous avons ensuite groupé les nucléosomes α et α -faux1bras ainsi que les nucléosomes β et β -faux1bras. Après normalisation nous obtenons la proportion relative des nucléosomes dans les états ($\alpha + \alpha$ -faux1bras), ($\beta + \beta$ -faux1bras) et (δ) au cours de la cinétique. L'erreur standard maximum est de 5 % pour chaque point. On remarque que l'état ($\alpha + \alpha$ -faux1bras) disparaît au profit de l'état (δ). On remarque l'augmentation transitoire de l'état ($\beta + \beta$ -faux1bras) puis sa disparition progressive. Ceci confirme le modèle proposant que β est un état transitoire de la réaction $\alpha \rightarrow \beta \rightarrow \delta$.

Nous allons essayer maintenant de tirer de ces données quelques ordres de grandeurs caractérisant l'action de RSC sur un nucléosome et en particulier la consommation en ATP et la vitesse de glissement. La concentration en nucléosomes dans notre expérience est de 12 nM. Pour faire ces calculs, nous supposons que la condition $[RSC] = 1.75 \mu\text{L}$ correspond à environ 1 moteur RSC pour 40 nucléosomes. Cette estimation est établie à partir de la quantification sur gel SDS-page de la sous-unité ATPase du complexe mais reste approximative à un ordre de grandeur près. En effet, il est difficile d'estimer la proportion de moteurs actifs.

Sur les cartes de la Figure 121, nous observons un glissement total (tous les nucléosomes dans l'état glissé (δ)) pour $500 \mu\text{M} < [ATP] < 1\text{mM}$. On en déduit qu'il faut $\sim 6 \cdot 10^5$ molécules d'ATP par RSC pour glisser tous les nucléosomes. La réaction durant 30 minutes, ceci correspond à une consommation d'environ 80 ATP par RSC et par seconde. On peut comparer cette valeur aux travaux de Cairns *et coll.* (Fischer *et coll.* 2007) qui trouvent une consommation de 8 molécules d'ATP par RSC et par seconde mais pour la translocation par RSC d'ADN nu. La différence entre ces deux valeurs n'est pas surprenante étant donné que les substrats sont différents : le nucléosome représente un obstacle à la translocation de l'ADN par RSC. De plus, il n'est pas exclu qu'une partie de cet ATP soit utilisé dans notre expérience par RSC pour agir sur l'ADN nu des bras du nucléosome, action que nous ne pouvons visualiser et donc quantifier. Si nous considérons maintenant la consommation d'ATP nécessaire à la première étape c'est à dire la formation de l'état

remodelé (β), on voit qu'elle est maximum pour $100 \mu\text{M} < [\text{ATP}] < 200 \mu\text{M}$. Le même calcul nous donne ~ 20 ATP par RSC et par seconde.

Toujours en supposant que le ratio enzyme / nucléosome vaut 0.025, et qu'il faut 30 minutes pour glisser tous les nucléosomes de 100 pb, on peut estimer une vitesse effective du glissement du nucléosome de ~ 2 pb par seconde et par RSC. Cette valeur est à comparer aux résultats de molécules uniques de Bustamante *et coll.* (Zhang *et coll.* 2006) qui trouvent ~ 13 pb par seconde et par RSC sur un substrat nucléosomal ou Bensimon *et coll.* (Lia *et coll.* 2006) qui obtiennent une valeur de ~ 200 pb par seconde et par RSC sur l'ADN.

Ces différentes estimations, bien que très approximatives, sont compatibles avec les mesures déjà réalisées avec RSC en molécules uniques. Les différences ont essentiellement 2 origines : l'erreur importante sur l'estimation de la quantité de moteurs actifs dans nos expériences, et le fait que nous estimions ces valeurs pour l'ensemble des nucléosomes dans une expérience. En effet, on peut imaginer par exemple que nous sous-estimons la vitesse de glissement de RSC car nous ne prenons pas en compte le temps où RSC est actif sur le nucléosome mais plutôt le temps total de la réaction pour les 2000 nucléosomes.

En résumé, nous avons vu que la réaction de remodelage par RSC et SWI/SNF produit de manière ATP-dépendante un état intermédiaire sur-complexé (β), positionné au même endroit que le nucléosome initial et que l'on ne détecte pas de positions intermédiaires bien définies dans le glissement. On peut interpréter ce dernier résultat en supposant que le complexe moteur+nucléosome est processif, et que s'il existe des pas ou des pauses, ceux-ci se font lors que le moteur est lié au nucléosome.

A ce stade, on peut néanmoins proposer que la réaction de remodelage se fasse en deux étapes distinctes : la première est une étape de préparation du nucléosome où le moteur pompe de l'ADN supplémentaire à l'intérieur du NCP puis se décroche que l'on appellera 'remodelage' ; la seconde est réalisée lors d'une deuxième liaison du moteur sur le nucléosome remodelé et correspond au glissement de celui-ci jusqu'à l'extrémité de l'ADN disponible.

Par ailleurs, en collaboration avec Manu Shukla, nous avons vu qu'il est possible d'isoler et de purifier par gel l'état intermédiaire (β). Ceci confirme que cet état est stable et nous permet de proposer le modèle suivant (Figure 124).

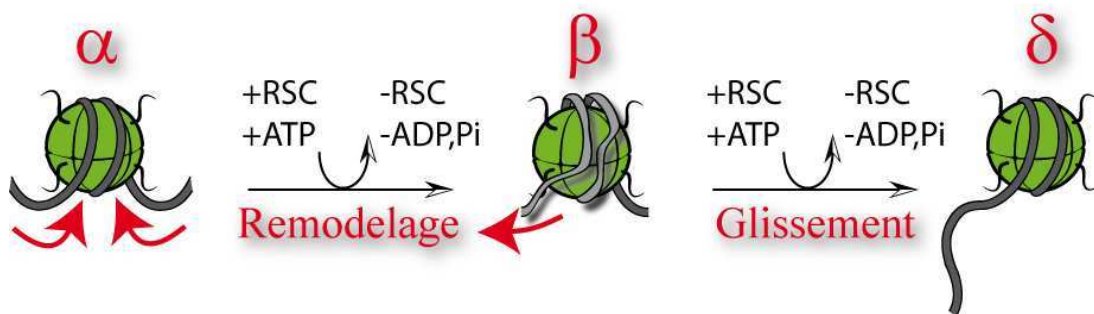


Figure 124 : Modèle de la réaction de remodelage par SWI/SNF et RSC

Dans un premier temps, l'hydrolyse de l'ATP est utilisée par le moteur pour remodeler un nucléosome en pompant ~ 15 - 25 pb d'ADN de part et d'autre de l'octamère. Dans un deuxième temps, l'hydrolyse de l'ATP par le moteur permet la translocation de l'ADN pour glisser le nucléosome à l'extrémité du fragment.

Pour entrer un peu plus dans le mécanisme de cette réaction, nous allons voir dans la partie suivante le rôle important du domaine d'accrochage ou *docking domain* de H2A sur le mécanisme de remodelage.

5.1.3 SWI/SNF et domaine d'accrochage de H2A

Pour comprendre le mécanisme du remodelage plus avant, nous avons cherché à savoir si le domaine d'accrochage qui fait le lien entre le tétramère $(H3-H4)_2$ et le dimère $(H2A-H2B)$ est nécessaire au phénomène de glisse par SWI/SNF. En effet, il est connu que le variant H2A.Bbd n'est pas déplacé par ce complexe (Angelov *et coll.* 2004; Doyen *et coll.* 2006) et qu'il est différent de H2A notamment au niveau du domaine d'accrochage (Bao *et coll.* 2004). De plus, comme nous l'avons montré dans la section 3.4, ce faible accrochage est à l'origine de l'altération structurale et dynamique des mono-nucléosomes H2A.Bbd. La question se pose donc de savoir si liaison plus lâche entre les dimères et le tétramère est également la cause principale de la non-mobilisation de H2A.Bbd ?

Pour y répondre, en collaboration avec Dimitar Angelov et Cécile Doyen, nous avons réalisé des expériences de glissement visualisé par AFM avec des nucléosomes variants H2A.Bbd et des chimères Bbd.ddH2A (section 3.4) dans le but de confirmer que l'absence du domaine d'accrochage (ddH2A) empêche le glissement par SWI/SNF.

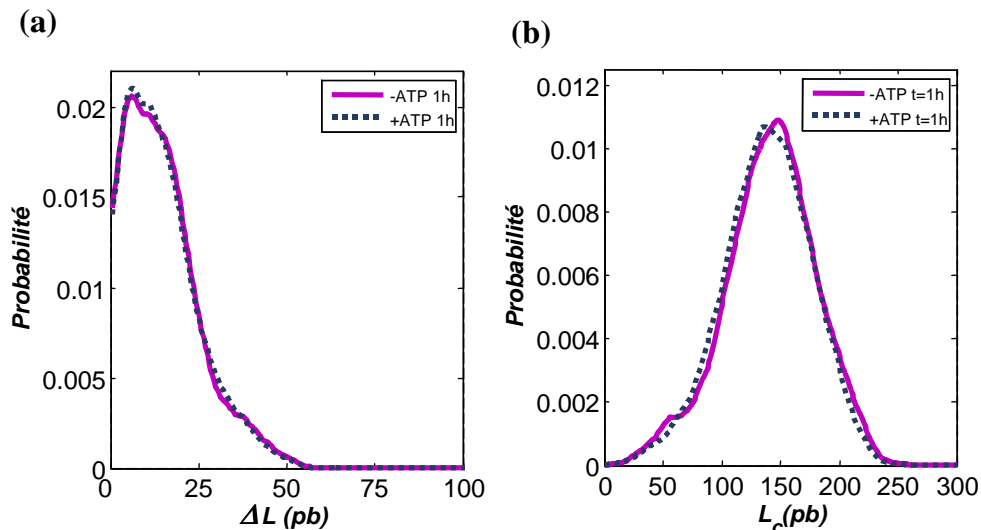


Figure 125 : Distributions de position et de longueur complexée pour des mono-nucléosomes variants H2A.Bbd au cours du remodelage par SWI/SNF

Distributions de (a) position ΔL et (b) longueur complexée L_c de nucléosomes variants H2A.Bbd incubés une heure avec SWI/SNF, en l'absence et en présence d'ATP. On note aucun changement ni de position ni de longueur complexée du nucléosome H2A.Bbd après l'action de SWI/SNF.

Nous avons tout d'abord étudié le glissement des nucléosomes H2A.Bbd. Comme on le voit sur la Figure 125 présentant les distributions de L_c et ΔL sans et avec ATP, on n'observe aucune modification de ces deux distributions après une heure d'incubation en présence du moteur et de l'ATP (conditions pour lesquelles le nucléosome conventionnel est glissé. Nous confirmons donc que ces nucléosomes variants H2A.Bbd ne sont pas glissés par SWI/SNF, et nos résultats suggèrent également que l'ADN n'est pas non plus redistribué au sein du complexe et ne forme pas d'état (β).

En ce qui concerne les mono-nucléosomes chimères Bbd.ddH2A, on a une situation intermédiaire entre H2A et H2A.Bbd. En effet, on observe un faible glissement et un changement de la distribution de longueur complexée comme on peut le voir sur la distribution de position de la Figure 126a. Cependant, le nombre d'événements mesurés étant trop faible, nous ne pouvons pas tracer de carte $L_c/\Delta L$ qui nous permettrait de voir si l'état (β) est également un intermédiaire du glissement de ces nucléosomes chimères. Nous pouvons simplement remarquer que restaurer le

domaine d'accrochage de H2A permet de restaurer partiellement la capacité du nucléosome à interagir avec SWI/SNF et à être glissé.

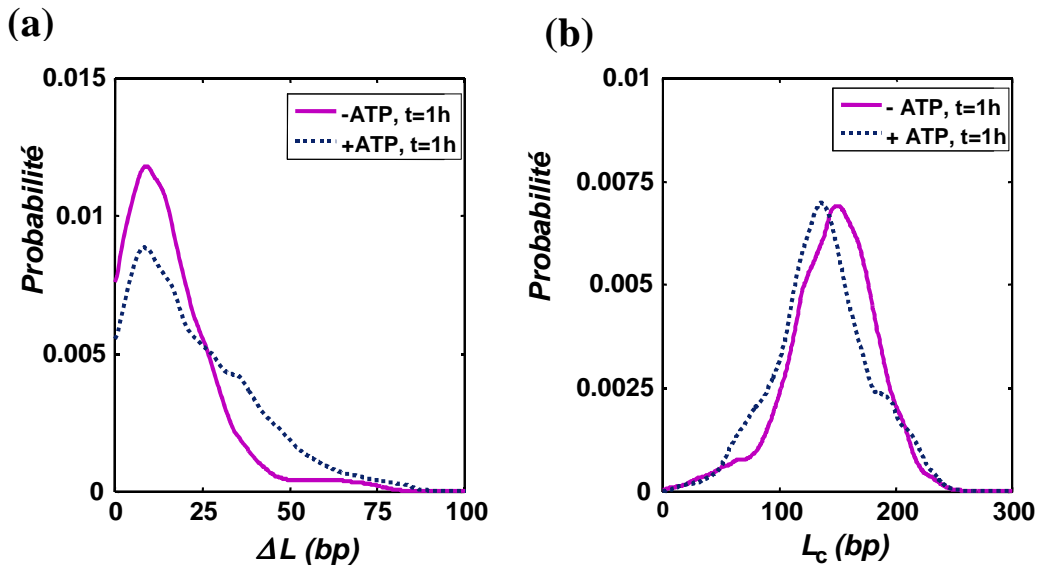


Figure 126 : Distributions de position et de longueur complexée pour des mono-nucléosomes chimères Bbd.ddH2A au cours du remodelage par SWI/SNF

Distributions de (a) position ΔL et (b) longueur complexée L_c de nucléosomes chimères Bbd.ddH2A incubés une heure avec SWI/SNF, en l'absence et en présence d'ATP. On remarque un changement de position et de longueur complexée montrant que le nucléosome chimère est à la fois glissé et remodelé par SWI/SNF de manière intermédiaire à H2A et H2A.Bbd. Notons cependant que la faible statistique des événements mesurés ne nous permet pas d'analyse 2D.

En résumé, l'ensemble de nos résultats sur ces nucléosomes variants et chimères montrent que, même si le domaine d'accrochage permet de retrouver à l'équilibre la longueur complexée d'ADN du nucléosome conventionnel (cf. section 3.4.3), il ne permet que partiellement de retrouver la mobilité du nucléosome sous l'action de SWI/SNF. Le domaine 'histone fold' de H2A.Bbd dans son intégralité est donc responsable de la plus faible mobilité de ce nucléosome variant (Doyen *et coll.* 2006).

Si l'ajout d'un domaine d'accrochage fonctionnel à un nucléosome variant H2A.Bbd ne permet pas de recouvrer totalement la mobilité sous l'action de SWI/SNF, on peut se demander si à l'opposé, il serait possible de réduire la mobilité ou de bloquer le nucléosome dans l'état (β) en remplaçant le domaine d'accrochage de H2A par celui tronqué de H2A.Bbd ?

5.2 RSC et mono-nucléosomes marqués

Après avoir étudié les mécanismes et les états intermédiaires du remodelage, nous nous sommes intéressés à la directionnalité du déplacement : la longueur relative de chacun des bras libres a-t-elle un effet sur la direction choisie ? Le moteur choisi-t-il un bout du fragment plutôt que l'autre ? Subit-il un effet de séquence ?

Pour essayer de répondre à ces questions nous avons construit un nucléosome marqué à l'extrémité d'un des deux bras libres nous permettant de mesurer indépendamment chacun des deux bras. En effet, dans la configuration utilisée jusqu'à présent, nous avons vu que la mesure de la position n'était pas signée : on ne distingue pas le bras 'droit' du bras 'gauche' mais seulement le

bras long du bras court. Au cours de la réaction de glissement, le bras long peut devenir le bras court et réciproquement : on mélange donc certains événements. Avec le nucléosome marqué, nous pouvons suivre la position absolue du nucléosome : nous ne mesurons plus une distance au centre du fragment comme précédemment ($0 > \Delta L > L_{tot}/2$) mais une position signée, ΔL , pouvant varier de $-L_{tot}/2$ jusqu'à $+L_{tot}/2$.

5.2.1.1 Protocole et visualisation des mono-nucléosomes marqués

Pour réaliser un tel nucléosome nous avons choisi de fonctionnaliser l'extrémité 5' du brin codant par une biotine par l'utilisation d'amorces marquées lors de la PCR. L'ADN ainsi produit est alors mélangé aux histones pour effectuer la reconstitution des nucléosomes. Après cette étape nous ajoutons aux nucléosomes formés un large excès de streptavidine pendant une nuit puis, nous éliminons l'excès de streptavidine (en utilisant un filtre de type Microcon). En nous plaçant dans ces conditions « cinétiques », nous obtenons un marquage total des nucléosomes et chaque streptavidine tétravalente n'est liée qu'à un seul nucléosome. La liaison biotine-streptavidine étant extrêmement stable ($K_d \sim 10^{-15}$ M) elle ne risque pas, à priori, d'être dissociée durant le remodelage. Ce protocole est le plus efficace de ceux que nous avons testés. En effet, l'ajout de la streptavidine avant la reconstitution interfère avec celle-ci, et nous avons préféré ne pas ajouter la streptavidine après réaction avec le remodeleur pour ne pas risquer que le marquage par la streptavidine ne déstabilise un nucléosome remodelé et glissé du côté de la biotine. Enfin, nous avons finalement opté pour la streptavidine et non pas l'avidine car du fait de sa charge ($pI_{avidine} = 10$ et $pI_{streptavidine} = 5.5$) les nucléosomes marqués avidine ont une affinité trop faible pour la surface AP-mica positivement chargée.

La streptavidine étant une protéine de 50 kDa, elle est parfaitement visualisable en AFM et apparaît à l'extrémité d'un des bras plus petite que le NCP (~ 200 kDa). On peut voir sur les images de la Figure 127 des images AFM typiques de nucléosomes marqués selon le protocole décrit plus haut.

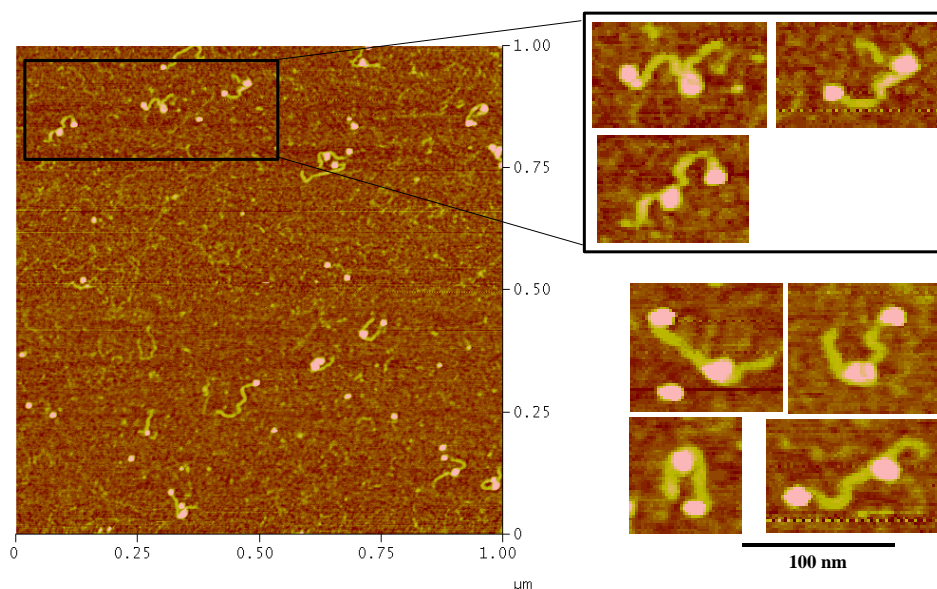


Figure 127 : Exemple d'images AFM de nucléosomes longs et asymétriques marqués par une streptavidine

Images AFM de topographie des mono-nucléosomes longs asymétriques (127s-601-82) marqués par une streptavidine à l'extrémité du bras long. Sur les zooms à droite, on peut distinguer le NCP (~ 200 kDa) et la streptavidine (~ 50 kDa) à l'extrémité du bras le plus long. Echelle Z : de 0 à 2.5 nm.

On peut s'attendre à ce que la présence de deux bras de longueurs différentes puisse induire une directionnalité du moteur par un effet stérique (Dang *et coll.* 2006). Pour tester cette hypothèse, nous avons choisi de comparer le glissement d'un nucléosome symétrique et d'un nucléosome asymétrique. Afin de s'affranchir d'un éventuel effet 'parasite' de la streptavidine, nous avons utilisé comme contrôle un deuxième nucléosome asymétrique comportant la streptavidine à l'autre extrémité.

Nous avons donc produit trois fragments d'ADN différents pour réaliser ces expériences. Un fragment où le 601 est entouré des côtés 5' et 3' respectivement de 127 et 82 pb avec la biotine du côté le plus long (fragment 127b-601-82), un autre où le 601 est entouré des côtés 5' et 3' respectivement de 82 et 127 pb avec la biotine du côté le plus court (fragment 127-601-82b) et enfin un dernier où le 601 est entouré des côtés 5' et 3' de 82 pb avec la biotine sur le coté 5' (fragment 82b-601-82). Nous avons donc obtenu trois types de nucléosomes : deux asymétriques où la streptavidine est soit placée sur le bras court soit sur le bras long (127s-601-82 et 127-601-82s) et un autre qui est symétrique (82s-601-82) (Figure 128).

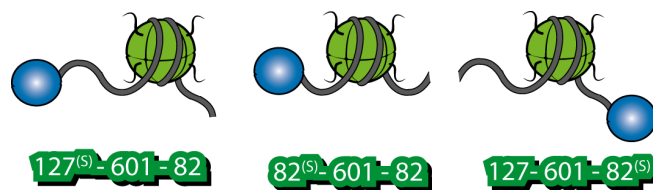


Figure 128 : Les différentes constructions utilisées pour reconstituer des nucléosomes marqués asymétriques et symétriques

L'ADN positionnant 601 avec deux bras symétriques de 82 pb ou avec un bras long de 127 pb et un bras court de 82 pb est marqué une extrémité par une biotine. Après reconstitution des nucléosomes, le nucléosome se lie à la streptavidine (en bleu) à son extrémité biotinylée pour former un nucléosome marqué identifiable à l'AFM. Notre protocole nous permet d'obtenir un marquage total des nucléosomes et chaque streptavidine tétravalente n'est liée qu'à un seul nucléosome

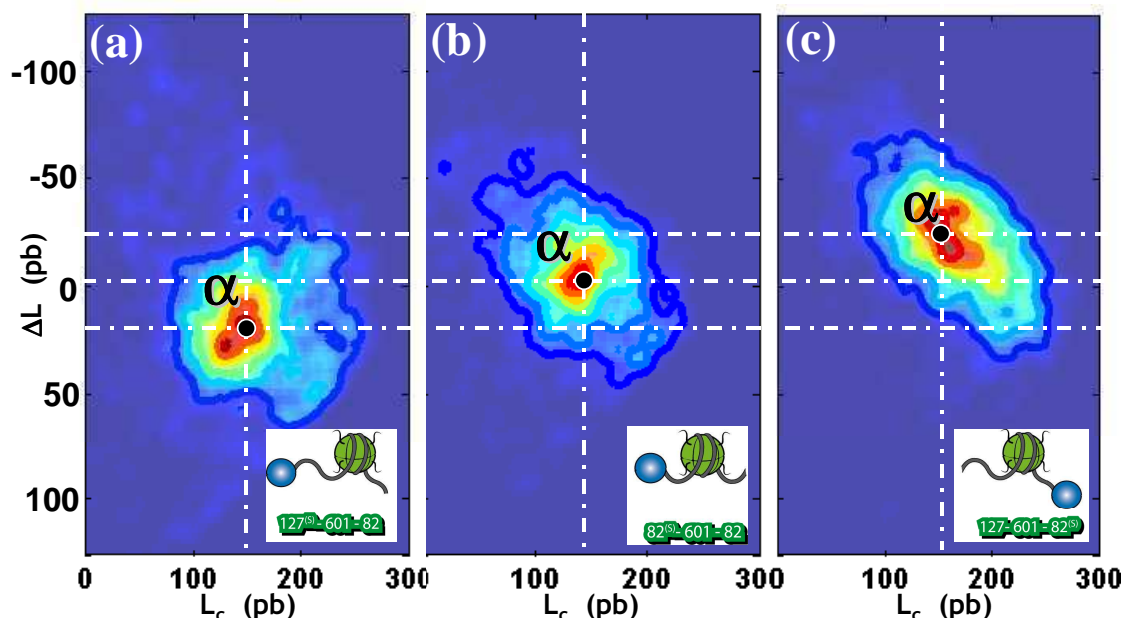


Figure 129 : Cartes $L_c/\Delta L$ de mono-nucléosomes marqués à l'équilibre

Cartes $L_c/\Delta L$ pour les nucléosomes marqués (a) 127s-601-82 (b) 127-601-82s et (c) 82b-601-82 à l'équilibre. Pour les trois constructions utilisées, on retrouve les positions de l'état initial (α) attendues : $\Delta L(\alpha) = (L_{\text{strepta}} - L_{\text{libre}})/2 \sim +22$ pb pour le nucléosome 127s-601-82, $\Delta L(\alpha) \sim -22$ pb, pour le nucléosome 127-601-82s et $\Delta L(\alpha) \sim 0$ pb pour le nucléosome 82b-601-82

Le programme d'analyse des images a été adapté pour mesurer les longueurs de deux bras des nucléosomes marqués (voir section 2.2.4). On définit alors $L_{strepta}$, la longueur du bras comportant la streptavidine et L_{libre} , la longueur du bras libre, d'où : $\Delta L = (L_{strepta} - L_{libre})/2$. Si l'on représente l'histogramme à 2D de la position et de la longueur complexée du nucléosome comme précédemment, on obtient une carte $L_c/\Delta L$ où ΔL peut maintenant être positif ou négatif. Les cartes $L_c/\Delta L$ obtenues pour ces trois constructions nucléosomales différentes sont représentées sur la Figure 128 pour le nucléosome à l'équilibre. On retrouve les positions attendues : $\Delta L(\alpha) = (L_{strepta} - L_{libre}) \sim +22$ pb pour le nucléosome 127s-601-82, $\Delta L(\alpha) \sim -22$ pb, pour le nucléosome 127-601-82s et $\Delta L(\alpha) \sim 0$ pb pour le nucléosome 82s-601-82.

Après avoir caractérisé nos objets à l'équilibre, intéressons nous à leur comportement en présence du facteur de remodelage RSC.

5.2.1.2 Glisse des nucléosomes marqués par RSC

En utilisant le même protocole que pour les nucléosomes non marqués (section 5.1.1.1), nous avons réalisé des instantanés de la réaction avec RSC pour les trois constructions et nous avons obtenu les cartes $L_c/\Delta L$ de la Figure 130, pour les deux constructions asymétriques. On retrouve sur ces cartes les états cités précédemment : l'état initial (α), l'état remodelé (β) et l'état glissé (δ). Dans tous les cas, l'état (β) est unique et positionné aux coordonnées ($L_c \sim 200$ pb, $\Delta L \sim -10$ pb), et présente donc la même longueur de complexation que lors du remodelage par RSC des mono-nucléosomes longs non marqués.

Si le moteur est directionnel, et que cette directionnalité est liée à l'existence d'une asymétrie de la longueur des bras, on peut s'attendre à ce que le nucléosome symétrique se retrouve glissé de manière équiprobable à chaque extrémité, donc de manière équiprobable à l'opposé ou contre la streptavidine, états que nous nommerons respectivement (δ_1) et (δ_2) et qui étaient confondus dans l'état (δ) pour les nucléosomes non marqués. Le nucléosome asymétrique devrait lui être glissé majoritairement d'un côté (bras court ou bras long selon la direction privilégié). Comme nous avons deux constructions de nucléosomes asymétriques marqués, on s'attend donc à obtenir un état glissé majoritaire (δ_1) ou (δ_2) pour l'une des constructions asymétriques, et l'inverse pour l'autre.

Ce n'est pas ce que nous observons sur les cartes $L_c/\Delta L$ expérimentales de la Figure 130. En effet, on remarque que l'on trouve majoritairement l'état glissé (δ_1) positionné aux coordonnées ($L_c \sim 130$ pb, $2\Delta L \sim 200$ pb) pour les deux constructions asymétriques. Dans le cas symétrique, nous observons également un état majoritaire glissé (δ_1) (cartes $L_c/\Delta L$ non présentées). Tout se passe donc comme ci très peu de nucléosomes étaient glissés vers la streptavidine par le moteur RSC. Cependant, comme nous l'avons mentionné dans le chapitre 2 'Méthodes' (section 2.2.4), l'analyse d'image des mono-nucléosomes marqués peut potentiellement être la source de l'absence de détection de ces mono-nucléosomes glissés contre la streptavidine, puisque que dans certains cas, le programme est incapable de discerner le NCP de la streptavidine lorsque ces deux objets sont trop proches l'un de l'autre ($d_{NCP-streptavidine} \leq 2 r_{NCP}$).

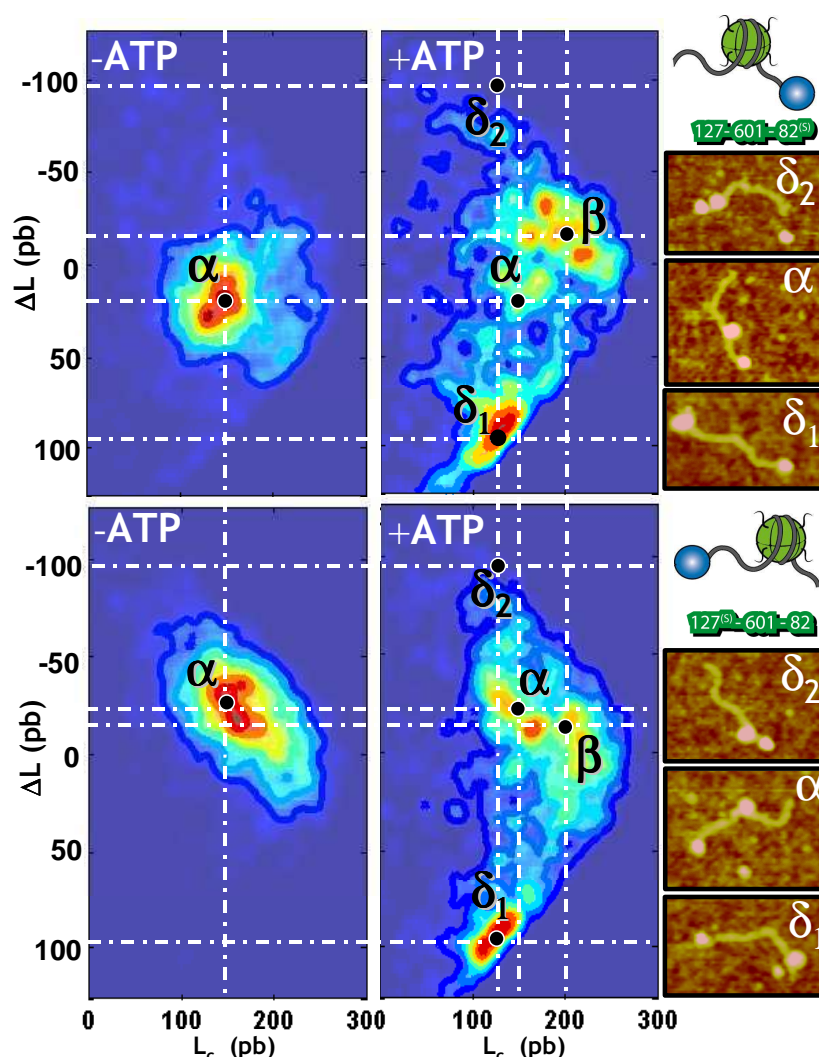


Figure 130 : Cartes $L_c/\Delta L$ pour des nucléosomes asymétriques marqués avant et après glissement par RSC

Cartes $L_c/\Delta L$ pour les nucléosomes marqués (en haut) 127-601-82s (en bas) 127s-601-82 en présence de RSC et (à gauche) en absence ou (à droite) en présence d'ATP. On remarque les états (α), (β) et (δ) décrits pour les mono-nucléosomes non marqués. Dans ce cas l'état (δ) est scindé en deux types de nucléosomes : (δ_1), le cas où le glissement est orienté à l'opposé de la streptavidine et (δ_2), le cas où le glissement est orienté vers la streptavidine. On remarque que les nucléosomes (δ_1) sont largement majoritaires par rapport aux nucléosomes (δ_2) pour les deux constructions asymétriques.

Pour vérifier cette hypothèse, nous avons donc compté manuellement à partir des images AFM le nombre de nucléosomes glissés vers la streptavidine ou à l'opposé de la streptavidine. Le résultat de ce comptage est présenté sur l'histogramme de la Figure 131. On remarque que les proportions relatives de nucléosomes dans l'état (δ_1) et de nucléosomes dans l'état (δ_2) sont constantes ($\sim 70\%$ pour (δ_1), $\sim 30\%$ pour (δ_2)) et ne dépendent pas de la construction utilisée. Nous avons donc effectivement sous estimé le nombre de nucléosomes glissés vers la streptavidine avec l'analyse d'image automatique, mais nous l'avons fait de manière équivalente pour les deux constructions asymétriques, ce qui ne change pas le résultat : la direction du mouvement n'est pas influencée par la longueur des bras libres du nucléosome mais par la présence (ou l'absence) du marqueur streptavidine. Ce résultat est à priori assez décevant puisque nous avons intégré ce marqueur pour mesurer la directionnalité et non pour l'influencer.

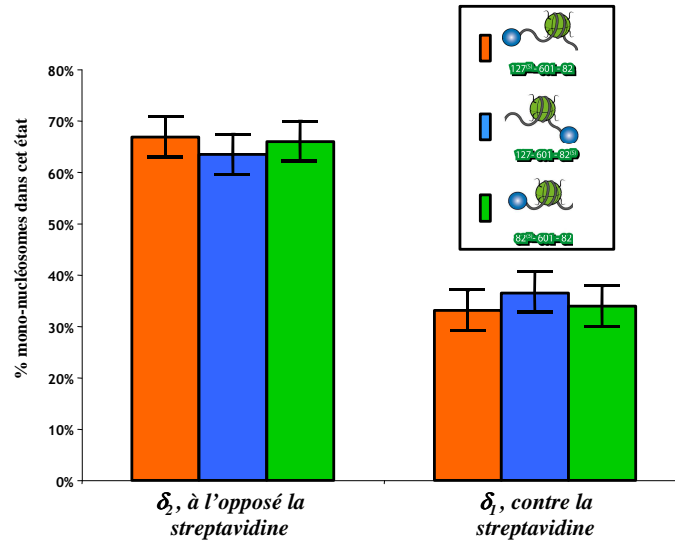


Figure 131 : Comptage des nucléosomes marqués glissés par RSC

Nous avons compté manuellement à partir des images AFM la proportion relative de nucléosomes glissés à l'opposé de la streptavidine (état (δ_1)) ou contre la streptavidine (état (δ_2)), pour l'expérience de remodelage par RSC des trois types de nucléosomes marqués 127s-601-82 (en orange), 127-601-82s (en bleu) et 82s-601-82 (en vert).

5.2.1.3 Repliement des cartes $L_c/\Delta L$ des mono-nucléosomes marqués

Il est possible de 'replier' les cartes $L_c/\Delta L$ des nucléosomes marqués pour les comparer à celles que nous avons obtenues pour les nucléosomes non marqués en remplaçant ΔL par $|\Delta L|$. Ce faisant, nous « effaçons » l'information liée à la présence de la streptavidine pour vérifier que l'on retrouve bien les cartes non signées précédentes. C'est ce qui est présenté sur la Figure 132, où l'on observe la similarité des cartes $L_c/\Delta L$ des nucléosomes marqués repliés avec celles des nucléosomes non marqués (Figure 120 par exemple).

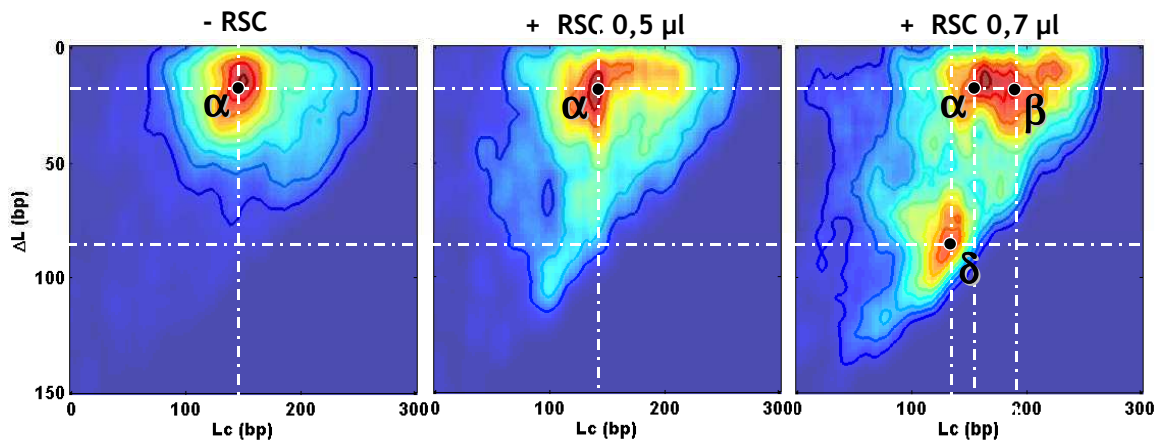


Figure 132 : Repliement des cartes $L_c/\Delta L$ des nucléosomes marqués au cours du remodelage par RSC

Cartes $L_c/|\Delta L|$ pour des nucléosomes marqués (127s-601-82) 'repliés' en remplaçant ΔL par $|\Delta L|$ pour comparaison avec les cartes des nucléosomes non marqués, pour 3 concentrations différentes en moteur RSC pour un temps d'incubation constant $t = 30$ min et une concentration en ATP constante $[ATP] = 1$ mM. Toutes les cartes sont représentées pour une même échelle de couleur correspondant à une même échelle de probabilité. On note la présence des mêmes états (α), (β) et (δ) que pour les nucléosomes non marqués, et l'absence de l'état (β -faux-1-bras).

Les mêmes états (α), (β) et (δ) sont présents au même endroit, seul l'état (β -faux-1-bras) est absent dans ce cas. On peut l'expliquer en supposant que la streptavidine empêche stériquement le rapprochement des deux bras du nucléosome à l'origine de cet état.

Pour résumer, au cours des expériences de remodelage réalisées sur les nucléosomes marqués par la streptavidine, nous avons vu qu'il est possible, en marquant une extrémité du fragment d'ADN, de suivre la direction du mouvement du nucléosome lors du glissement. Comme pour les nucléosomes non marqués, on retrouve l'état remodelé (β) et l'état glissé (δ) sans observer d'intermédiaire de glissement. On observe, en outre, que la streptavidine influence ce mouvement en favorisant le glissement à l'opposé du fragment ADN dans une proportion $\sim 70\% / 30\%$ pour des conditions de glissement avancé.

Nous verrons dans le chapitre suivant, lorsque nous étudierons le glissement de di-nucléosomes que nous pourrions proposer un modèle expliquant que la streptavidine se comporte exactement de la même manière qu'un nucléosome figé à une position donnée, et que nous pourrions même prévoir quantitativement l'asymétrie de glissement observée.

5.3 Mono-nucléosomes et retour à l'équilibre

Nous avons jusqu'ici étudié le résultat immédiat de l'action du moteur. En quelque sorte, nous avons regardé le transfert hors équilibre des nucléosomes à partir de la position d'équilibre (le 601) vers une position excitée métastable (le bout du fragment). La question que nous nous sommes ensuite posée est la suivante : si le résultat de ce pompage est un nucléosome canonique, le système est probablement capable de relaxer thermiquement vers la situation d'équilibre. Pouvons-nous suivre ce retour vers l'équilibre ? Parcourt-il le même chemin réactionnel ? Quels paramètres expérimentaux pouvons-nous extraire de cette diffusion dans un potentiel ?

5.3.1 Principe de l'expérience de diffusion thermique du nucléosome

Avant de nous intéresser à ce mouvement de retour vers l'équilibre, nous devons présenter le mécanisme permettant ce déplacement : la diffusion thermique des nucléosomes. Nous avons vu dans la partie sur les mono-nucléosomes soumis à l'action de RSC (section 5.1.2) que lorsque l'on place le nucléosome à 29°C pendant une heure on n'observe pas de modification de la carte $L_c/\Delta L$. Tout ce se passe donc comme si la séquence positionnante 601 imposait un puits de potentiel énergétique suffisamment profond pour empêcher toute diffusion thermique (nous l'avons vérifié expérimentalement jusqu'à 47°C).

Physiquement, on peut expliquer cette stabilisation par la courbure intrinsèque de la séquence positionnante 601 (Lu *et coll.* 2008). Une séquence positionnante serait une séquence ADN dont la forme intrinsèque préfigure la forme de l'ADN dans le NCP. Il s'ensuit une grande stabilité de ces nucléosomes et la difficulté de sortir de cette position. Néanmoins on peut citer différentes études qui ont déjà par le passé observé une diffusion 1D des nucléosomes assistée par la température à partir de séquences moins positionnante que le 601 (puits de potentiel moins profond) (Meersseman *et coll.* 1992; Flaus *et coll.* 2003; Flaus *et coll.* 2004). Il a été observé dans ce cas que le coefficient de diffusion varie énormément avec la température, de sorte que la diffusion thermique peut être complètement inefficace à 4°C et suffisante pour déplacer un nucléosome de 100 pb en une heure à 29°C. Pour interpréter cette différence de comportement, Schiessel *et coll.* ont proposé un modèle dans lequel l'agitation thermique permet l'ouverture temporaire des sites de liaison ADN-histones les plus proches de l'entrée du nucléosome (Schiessel 2006). En se refermant, ces contacts sont susceptibles de piéger un défaut ou boucle d'ADN (de taille très variable) qui se propagera

rapidement le long du NCP. Le manque d'adéquation des données expérimentales avec ce modèle (au niveau de l'ordre de grandeur du coefficient de diffusion) les a conduit à proposer un modèle alternatif (Kulic *et coll.* 2003). Dans ce modèle, la diffusion du nucléosome activée par la température serait due à la création par les fluctuations thermiques d'un défaut de torsion de l'ADN à l'entrée du nucléosome susceptible, elle aussi, d'être ensuite propagée le long de l'ADN (voir section 1.3.3.1 et plus particulièrement la Figure 33). Dans les deux cas, le modèle nécessite la création de défauts coûteux en énergie ($E_{\text{barrière}} \sim 10$ à 30 kT) à partir des fluctuations thermiques du brin d'ADN. Cette réaction cinétiquement limitante est donc fortement dépendante de la température. En effet, on a la loi d'Arrhénius pour k la constante de la réaction :

$$k = Ae^{-E_{\text{barrière}} / k_B T}$$

où A et $E_{\text{barrière}}$ ne dépendent pas de la température en première approximation. Ceci implique que :

$$\frac{k(T = 4^\circ\text{C})}{k(T = 29^\circ\text{C})} = e^{\frac{E_{\text{barrière}}}{k_B T} \cdot \left(\frac{273+4}{273+29} - 1\right)} = e^{-30 \cdot 0.08} \approx 0.08$$

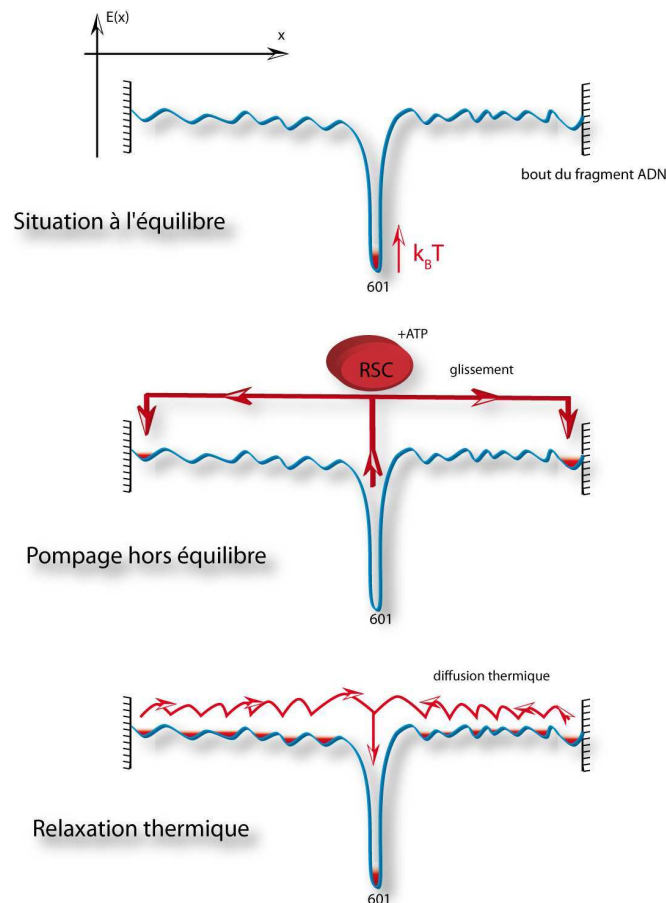


Figure 133 : Principe de l'expérience de diffusion thermique du mono-nucléosome 'pompé' par RSC

(en haut) A l'équilibre le nucléosome est piégé dans le puits de potentiel formé par la séquence positionnante profonde de plusieurs kT. Dans le cas de la séquence 601 même une augmentation de température de 4°C à 47°C ne permet pas de faire diffuser efficacement le nucléosome hors de cette séquence. (au milieu) Sous l'action de RSC le nucléosome est déplacé de manière ATP dépendante et donc hors équilibre vers les extrémités du fragment. (en bas) Du fait de la faible affinité du nucléosome pour les séquences non positionnantes présentes au bout du fragment il est possible d'observer la diffusion du nucléosome depuis les extrémités vers la position d'équilibre.

Donc la constante de réaction k change d'un facteur 13 entre 4°C et 29°C. Dans notre cas, avons vu que par un transfert hors équilibre induit par RSC (et alimenté par l'ATP) nous savons faire sortir le nucléosome de sa position d'équilibre dans la séquence 601 vers une position moins favorable énergétiquement comme l'extrémité du fragment. On s'attend à ce que, une fois dans cette position énergétique moins stable ($\Delta\Delta G \sim kT$), le nucléosome puisse être activé thermiquement et explorer le paysage énergétique avant de relaxer vers sa position d'équilibre dans le 601. C'est ce chemin cinétique de relaxation que nous souhaitons explorer, en particulier pour voir s'il est similaire au chemin cinétique emprunté par le nucléosomes 'à l'aller' c'est à dire hors d'équilibre (Figure 133).

5.3.2 Expérience de relaxation thermique et cartes $L_c/\Delta L$

Pour ce faire, nous avons préparé les nucléosomes dans l'état glissé (δ) au bout du fragment en les faisant réagir avec RSC pendant 60min à 29 °C pour un rapport [RSC] / [nucléosome] élevé. Ensuite, nous avons laissé la réaction se terminer à 4°C pendant 4 jours pour que le moteur consomme tout l'ATP présent. Puis, après avoir contrôlé que le mélange réactionnel contient une majorité de nucléosomes dans l'état (δ) (par dépôt et visualisation AFM, voir Figure 134b), nous avons réalisé une expérience de retour à l'équilibre. A la manière de ce que nous avons fait pour le remodelage, nous avons réalisé un instantané de cette diffusion en plaçant les nucléosomes (δ) à 36°C pour une durée de 120 minutes. Nous avons alors déposé les nucléosomes et réalisé une analyse $L_c/\Delta L$ des images AFM obtenues comme précédemment (voir Figure 114). Nous avons alors obtenu la carte $L_c/\Delta L$ de la Figure 134c.

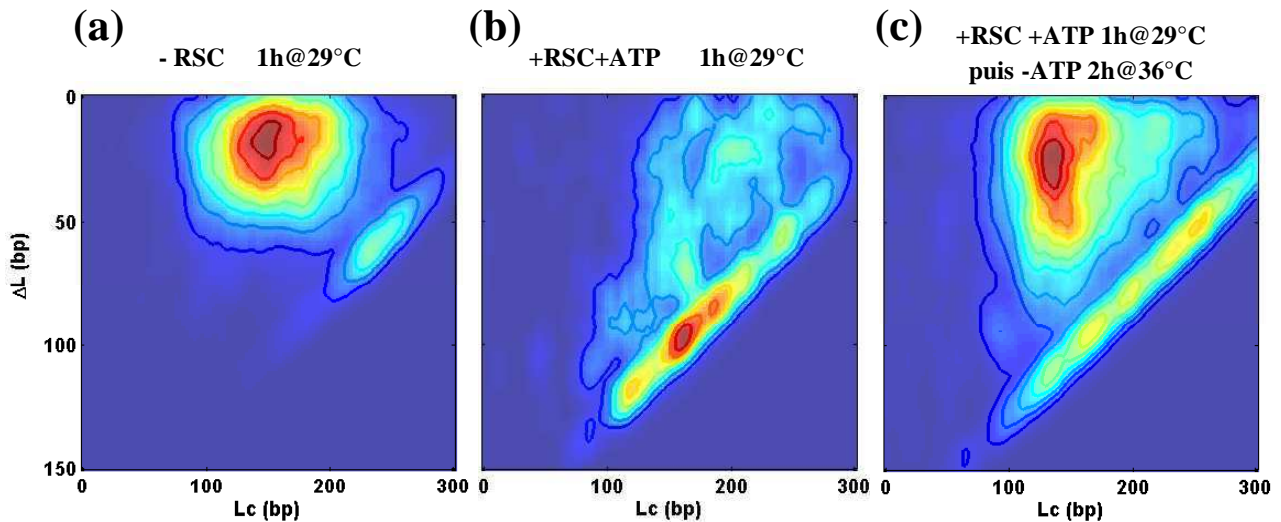


Figure 134 : Cartes $L_c/\Delta L$ du glissement par RSC puis du retour à l'équilibre des mono-nucléosomes par diffusion thermique

Cartes $L_c/\Delta L$ pour des mono-nucléosomes (a) avant glissement, (b) après glissement par RSC en présence d'ATP pendant 1 heure à 29°C et (c) après une étape supplémentaire de relaxation thermique pendant 2 heures à 36°C en l'absence d'ATP. La carte (c) correspond aux mono-nucléosomes de la carte (b) ayant relaxés thermiquement vers la position d'équilibre dans la séquence 601. On remarque que la distribution 2D $L_c/\Delta L$ des nucléosomes relaxés est plus large dans la direction ΔL que la carte de départ (a).

On remarque que la carte correspondant aux nucléosomes glissés (Figure 134b) est similaire à celle obtenue précédemment dans l'état stationnaire de remodelage par RSC (état (δ) majoritaire, voir par exemple Figure 119). Après 2 heures d'activation thermique, les nucléosomes ont quitté l'état (δ) et se retrouvent majoritairement dans un état sur la carte $L_c/\Delta L$ proche de l'état (α) de

départ. Toutefois, la position semble moins bien définie (distribution plus large dans la direction ΔL) que sur la carte de départ (Figure 134a). De plus, on remarque une faible proportion de nucléosomes sur-complexés sur la carte $L_c/\Delta L$ qui pourraient correspondre à des nucléosomes dans l'état (β). Cependant, nous n'avons pas de données enregistrées pour un temps de diffusion intermédiaire qui nous permettraient de vérifier que l'état (β) est aussi un état intermédiaire dans le cas de la relaxation vers l'équilibre.

En résumé, cette expérience nous a permis de montrer que l'activation thermique permet de faire diffuser les nucléosomes d'une position extrême vers la séquence positionnante 601. Pour compléter ces premières expériences, il serait nécessaire de réaliser une cinétique complète de relaxation thermique et de faire varier la température d'activation pour mieux comprendre le rôle de la température dans cette activation.

5.4 Essai de construction d'un modèle 2D commun pour les phénomènes de glissement et de relaxation

Pour essayer de modéliser à la fois les expériences réalisées en présence des facteurs de remodelage et celles que nous venons d'analyser lors du retour à l'équilibre, nous avons construit avec Martin Castelnovo, un modèle linéaire à deux dimensions (L_c et ΔL). Pour ce faire, nous avons étendu le modèle établi à une dimension pour décrire les distributions de longueur complexée à l'équilibre sur les mono-nucléosomes conventionnels (section 3.2) en y ajoutant deux ingrédients : l'effet de la position du nucléosome sur le fragment d'ADN (c'est à dire de la courbure intrinsèque de la séquence positionnante) et la donnée temporelle.

Sans rentrer dans le détail des calculs qui restent préliminaires, nous allons détailler les hypothèses et les premiers résultats de ce modèle simple. Ceci nous permettra de proposer une explication alternative de la sur-complexation observée lors du remodelage.

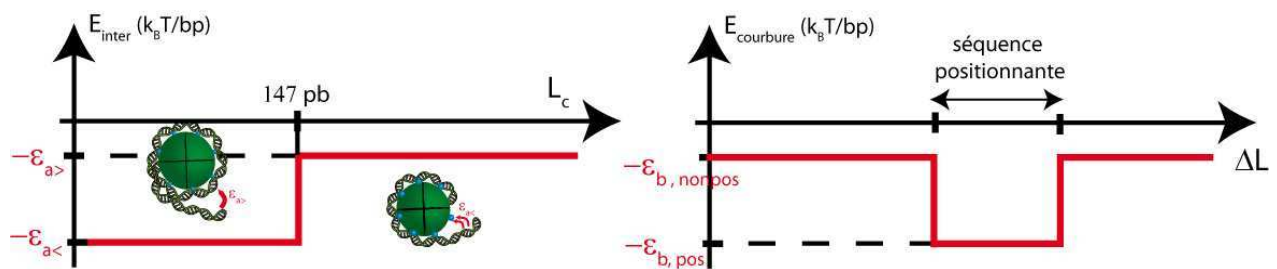


Figure 135 : Energies d'interaction et de courbure

(à gauche) Comme dans le modèle à l'équilibre l'enroulement d'ADN autour du cœur protéique est autorisé pour des valeurs supérieures à 147 pb mais avec un malus énergétique ($\epsilon_{a>} < \epsilon_{a<}$). (à droite) Lorsque le nucléosome est positionné dans la séquence positionnante (de 147 pb) l'énergie de courbure de l'ADN est réduite ($-\epsilon_{b,nonpos} > -\epsilon_{b,pos}$).

Pour construire ce modèle nous faisons les hypothèses suivantes (Figure 135):

1. On peut décrire l'énergie du nucléosome comme la somme de deux termes : E_{inter} , correspondant à la composante issue de l'énergie d'interaction histone-ADN (comme dans le modèle à l'équilibre) et un autre terme $E_{courbure}$ rendant compte de l'énergie de courbure de l'ADN. Néanmoins à la différence du modèle à l'équilibre, l'énergie de formation du nucléosome n'est pas constante mais dépend de la position du nucléosome. Ceci nous permet d'introduire le fait que celle-ci est plus basse lorsque le nucléosome est placé dans la

séquence positionnante ($\varepsilon_{b,pos}$) que lorsque le nucléosome est placé hors du 601 ($\varepsilon_{b,nonpos}$). Pour calculer l'énergie totale du nucléosome $E(L_c, \Delta L)$, on somme alors ces deux contributions pour chacune des paires de base de la configuration :

$$E_{(L_{c,0}, \Delta L_0)} = \int_0^{L_{c,0}} E_{inter}(L_c) dL_c + \int_{\Delta L_0 - L_{c,0}/2}^{\Delta L_0 + L_{c,0}/2} E_{courbure}(\Delta L) d\Delta L$$

- On fait l'hypothèse que l'on peut appliquer le principe de balance détaillée à l'équation maîtresse. Ceci correspond au fait que les taux de transition entre deux configurations i et j sont donnés par le rapport des poids de Boltzmann correspondant. Cela revient donc à faire l'hypothèse que notre système est en quasi-équilibre entre chaque pas de temps. L'équation maîtresse s'écrit :

$$\frac{dP(L_c, \Delta L; t)}{dt} = \sum_{L'_c, \Delta L'} k_{(L'_c, \Delta L') \rightarrow (L_c, \Delta L)} P(L'_c, \Delta L'; t) - k_{(L_c, \Delta L) \rightarrow (L'_c, \Delta L')} P(L_c, \Delta L; t)$$

et la balance détaillée :

$$\frac{k_{(L_c, \Delta L) \rightarrow (L'_c, \Delta L')}}{k_{(L'_c, \Delta L') \rightarrow (L_c, \Delta L)}} = e^{-\frac{E_{(L_c, \Delta L)} - E_{(L'_c, \Delta L')} \pm F \cdot d}{k_B T}}$$

- On suppose que les transitions autorisées pour une configuration $(L_c, \Delta L)$ donnée sont celles dirigées vers les configurations « voisines » : $(L_c+1, \Delta L+1/2)$, $(L_c-1, \Delta L-1/2)$, $(L_c-1, \Delta L+1/2)$, $(L_c+1, \Delta L-1/2)$ (voir aussi Figure 136). Ceci revient à supposer que le déplacement du nucléosome entre chaque pas de temps reste localisé au voisinage de la position initiale et ne correspond qu'à une faible perturbation de l'état de départ.
- Pour simuler l'effet d'une force les probabilités de transition, nous considérons que si la transition $i \rightarrow j$ conduit à un mouvement dans le sens de la force (c'est à dire à par exemple une transition de ΔL à $\Delta L+1/2$ pour une force dirigée vers les valeurs croissantes de ΔL) alors, on retranche le travail $dW = F \cdot dL$ à la différence $E_i - E_j$ de la balance détaillée à l'équilibre. Dans notre cas, $dL = \pm 1/2$, donc pour F dirigée vers les ΔL croissants, on a : $dW = \pm F/2$.

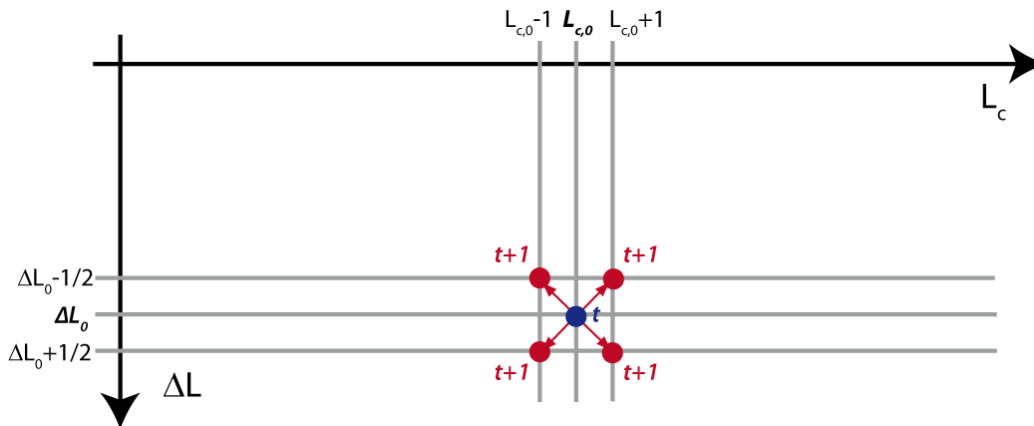


Figure 136 : Transitions autorisées dans le modèle

Dans le cadre de notre modèle, on suppose que les transitions autorisées pour une configuration $(L_c, \Delta L)$ donnée sont celles dirigées vers les configurations localisées au voisinage de la position initiale : $(L_c+1, \Delta L+1/2)$, $(L_c-1, \Delta L-1/2)$, $(L_c-1, \Delta L+1/2)$, $(L_c+1, \Delta L-1/2)$. Cela revient à supposer que le déplacement du nucléosome à chaque pas de temps ne correspond qu'à une faible perturbation de l'état de départ.

Avec ces hypothèses, nous pouvons construire des cartes $L_c/\Delta L$ ‘synthétiques’ à partir des paramètres énergétiques ($\epsilon_{a>}$, $\epsilon_{a<}$, $\epsilon_{b,pos}$, $\epsilon_{b,nonpos}$) de notre choix et étudier l’évolution de ces cartes en présence d’une force constante ou en laissant le système relaxer comme dans les expériences de retour à la position d’équilibre.

Sur l’exemple présenté sur la Figure 137, nous avons suivi l’évolution de la carte $L_c/\Delta L$ pour un nucléosome fictif positionné au centre d’une séquence positionnante énergétiquement équivalente au 601 et subissant une force dirigée vers les valeurs croissantes de ΔL . Par construction à $t = 0$, on a : $\Delta L = 75$ pb et $L_c = 147$ pb et les paramètres $\epsilon_{a>}$ et $\epsilon_{a<}$ sont ceux déduits des expériences à l’équilibre sur les mono-nucléosomes conventionnels (voir section 3.2.2).

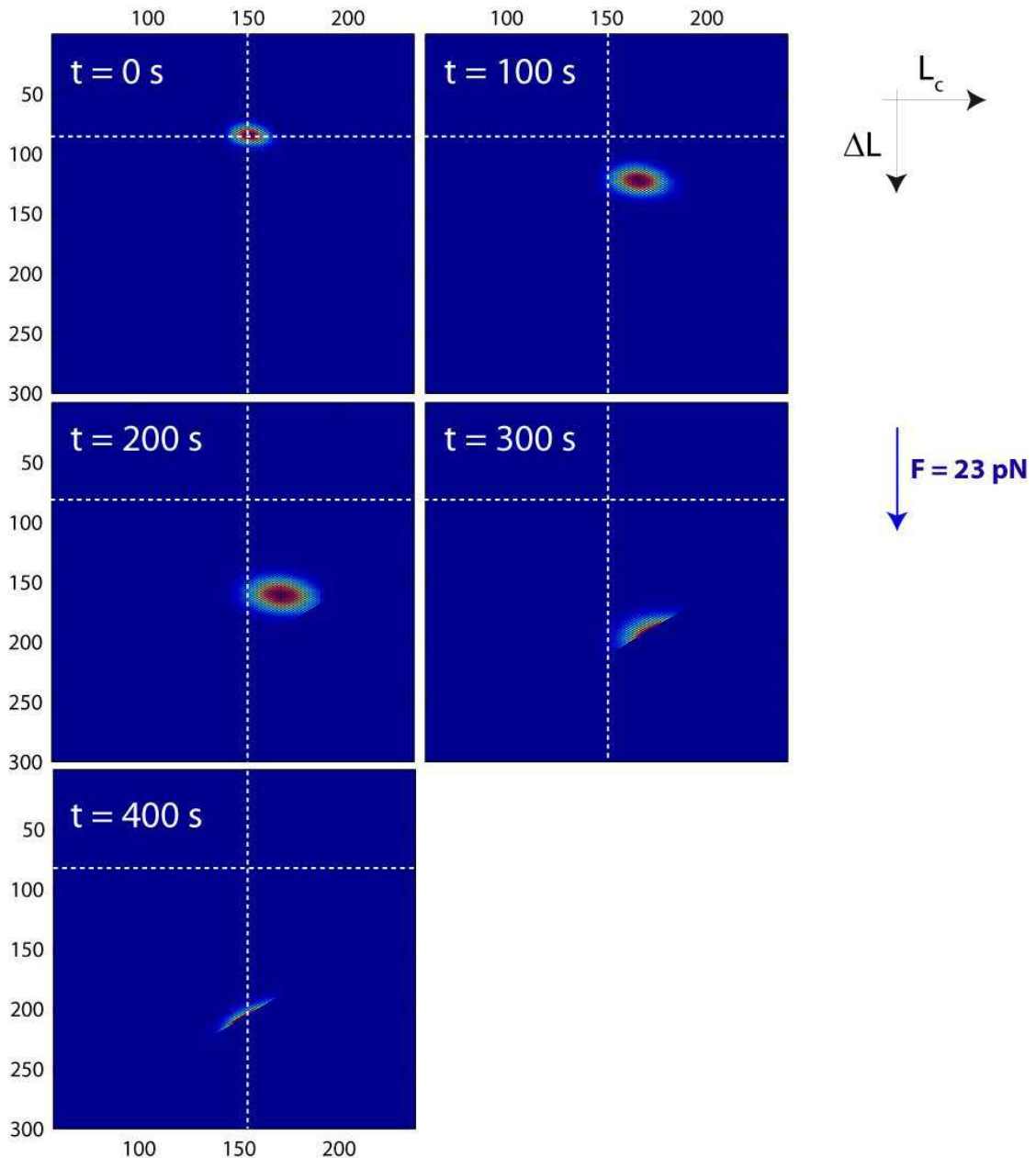


Figure 137 : Evolution des cartes $L_c/\Delta L$ ‘synthétiques’ en présence d'une force constante

Cartes $L_c/\Delta L$ simulées dans le cas où la force est dirigée vers les valeurs croissantes de ΔL et $F = 23$ pN. La position de départ ($t=0$) est le centre de la séquence positionnante 601. On remarque que dans ce cas, le nucléosome est bien glissé jusqu'à la position à l'extrémité du fragment en passant par un état sur-complexé.

On peut remarquer que lors de cette simulation, la distribution de probabilité $P(L_c, \Delta L)$ du nucleosome fictif est déplacée vers les valeurs croissantes de ΔL jusqu'à être confinée au bord du fragment d'ADN. En outre, on observe que même si l'état de départ ($t = 0$ s) et l'état d'arrivée ($t = 400$ s) présentent une longueur complexée moyenne proche de 147 pb, les états intermédiaires ($t = 100$ s, 200 s, 300 s) présentent quant à eux une longueur complexée supérieure ($\langle L_c \rangle \sim 180$ pb). Ceci montre qu'avec les éléments simples décrits plus haut il est possible de rendre compte d'une sur-complexation transitoire du nucléosome lors de son glissement hors-équilibre. En présence d'une force, le travail fourni par le moteur peut se transférer soit sur la composante d'interaction et conduire à une sur-complexation soit sur la composante de courbure et conduire à un glissement du système. Etant données nos hypothèses, tout se passe comme s'il était plus favorable énergétiquement pour le nucléosome d'étendre sa longueur complexée que de se déplacer. La sur-complexation observée expérimentalement serait donc indirectement la marque du travail nécessaire pour sortir le nucléosome hors de la séquence positionnante.

Le chemin retour observé en relâchant la force à partir de la position finale du système au bout du fragment ADN est plus complexe à prédire. En fonction des paramètres énergétiques utilisés, on peut observer soit le retour en 'ligne droite' vers la séquence positionnante 601, soit le passage par un état sur-complexé avant d'être à nouveau piégé par le 601. Le manque de données expérimentales sur la relaxation des nucléosomes ne nous permet pas, à l'heure actuelle, d'ajuster plus finement les paramètres énergétiques de la simulation.

Ces résultats sont donc tout fait préliminaires. Il convient en effet tout d'abord de valider certaines des hypothèses comme la localité des transitions ou la validité de la balance détaillée pour les forces utilisées. Expérimentalement, il convient de vérifier que l'utilisation d'une séquence moins positionnante modifie l'évolution des cartes $L_c/\Delta L$ (persistance de l'état (β) par exemple ?). Enfin, ce modèle ne prend pas en compte l'équilibre de liaison/dissociation du moteur sur le nucléosome alors que les mesures expérimentales sont restreintes aux nucléosomes non complexée avec le moteur de remodelage.

5.5 Conclusion et perspectives sur l'étude des mono-nucléosomes hors équilibre

Les expériences réalisées sur différents types de mono-nucléosomes remodelés par les moteurs RSC et SWI/SNF nous ont permis de mettre en évidence la présence d'un état intermédiaire de la réaction de remodelage. Cette particule nucléosomale stable présente environ 180 pb d'ADN et ne peut être formé que suite à une action ATP-dépendante de ces facteurs. Du point de vue fonctionnel, on peut interpréter ces objets comme des états accessibles aux enzymes de la réparation et aux facteurs de transcription et qui sont plus facilement produits que les nucléosomes glissés. On peut aussi les voir comme des états possédant un défaut de sur-complexation qui est ensuite potentiellement transloqué par les moteurs de remodelage.

Pour comprendre plus en détail leur structure et leur dynamique, il serait intéressant d'étudier la stabilité de cet état sur-complexé en fonction de la température et du temps. Ceci nous permettrait de mieux comprendre les paramètres énergétiques de ce type de nucléosome. Enfin, il serait utile de suivre de quelle manière chacun des bras est transloqué au sein du nucléosome et en particulier si ce mouvement se fait en seule étape. On peut penser utiliser dans ce cas des techniques de pontage résolues en temps comme celles utilisant les lasers UV (Angelov *et coll.* 2003).

6 Hors-équilibre : Les oligo-nucléosomes

Dans ce chapitre, nous nous intéressons aux mécanismes d'action de RSC sur des oligo-nucléosomes positionnés. Nous nous rapprochons ainsi de la situation physiologique dans laquelle le moteur travaille sur une fibre de chromatine comportant de très nombreux nucléosomes. Cette étude permet, par exemple, de tester l'effet de l'interaction nucléosome-nucléosome sur le glissement par RSC et permet de diminuer les effets de bords présents pour les mono-nucléosomes. Il est à noter qu'un nombre très restreint d'études ont abordé jusqu'ici l'action d'un facteur de remodelage dans ce contexte poly-nucléosomal puisque les méthodes biochimiques ne permettent pas de suivre deux nucléosomes (ou plus) simultanément (Ulyanova *et coll.* 2005).

L'approche utilisée ici nous permet de contrôler précisément la position de départ du nucléosome et de suivre de manière directe son évolution sous l'action du moteur. Néanmoins, à la différence de ce que nous avons fait pour les mono-nucléosomes, nous ne pourrions pas suivre la formation de l'état remodelé. En effet, déjà dans le cas des di-nucléosomes, il existe un nombre trop important de configurations possibles et le risque de croisement des bras d'ADN est grand ce qui réduit la résolution des méthodes utilisées précédemment. Nous avons donc choisi de réaliser un comptage manuel des différents états des di-nucléosomes en nous limitant à un nombre restreint de configurations. Dans un deuxième temps, nous nous intéresserons à l'étude de chromatines comportant 9 nucléosomes et nous appliquerons alors les outils développés pour l'étude de chromatine à l'équilibre.

6.1 RSC et di-nucléosomes positionnés

6.1.1 Visualisation du glissement de di-nucléosomes et regroupements

Tout comme pour les mono-nucléosomes, le principe de l'expérience sur les di-nucléosomes consiste à réaliser des instantanées de la réaction de glissement en déposant les di-nucléosomes mis en présence de RSC+ATP, à différentes étapes au cours du remodelage. Le fragment d'ADN utilisé comporte deux séquences positionnantes 601 séparées par un ADN de liaison de 58 pb et entourées de part et d'autre par des bras ADN de 63 et 81 pb (Figure 138). La production de cet ADN et la reconstitution des di-nucléosomes ont été réalisées par Hervé Menoni.

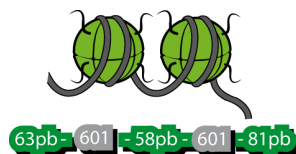


Figure 138 : Construction utilisée pour les di-nucléosomes

Le fragment d'ADN utilisé comporte deux séquences positionnantes 601 séparées par un ADN de liaison de 58 pb et entourées de part et d'autre par des bras ADN de 63 et 81 pb. La longueur totale du fragment d'ADN est de 496 pb et la longueur totale d'ADN libre est 202 pb.

La Figure 139 présente le résultat d'une expérience de glissement de di-nucléosomes et son contrôle sans ATP. Sur ces images AFM, on remarque dès la première observation que les di-nucléosomes sont positionnés comme attendu par construction du fragment d'ADN pour la condition - ATP mais ne le sont plus dans la condition +ATP. On note aussi la présence de mono-nucléosomes, qui se trouvent soit dans la séquence 601 soit à l'extrémité du fragment d'ADN.

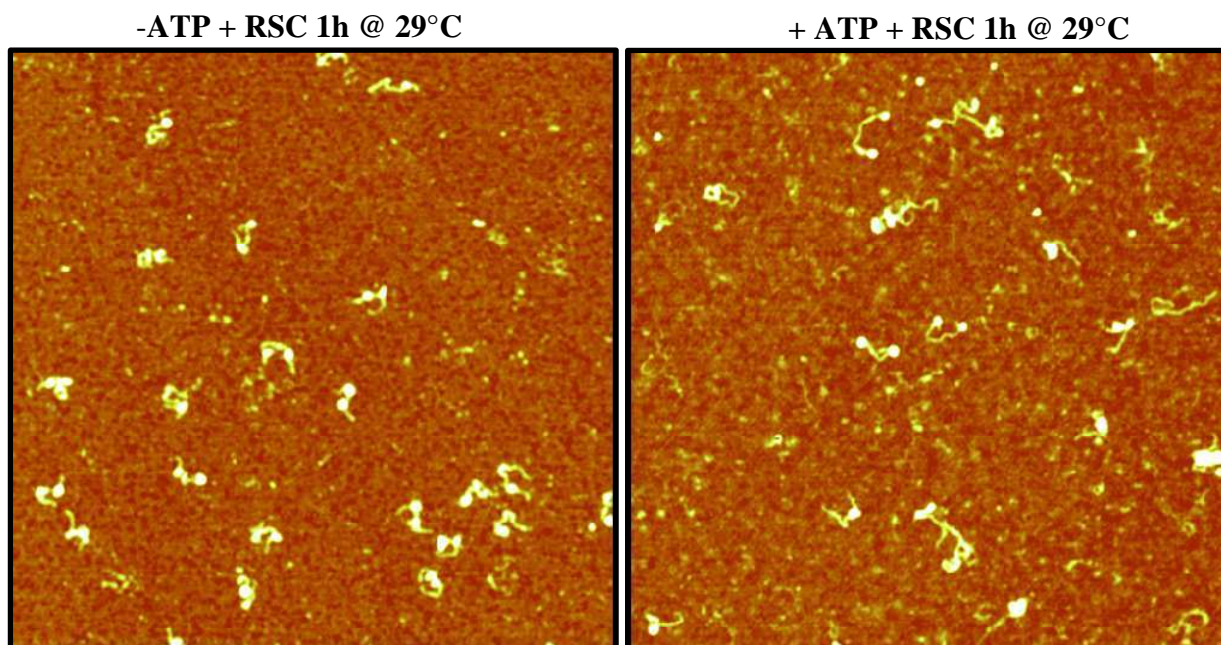


Figure 139 : Exemples d'images AFM de les di-nucléosomes en présence de RSC sans ou avec ATP

Images AFM de topographie de 1 x 1 μm . Echelle Z : de 0 nm (marron foncé) à 2.5 nm (blanc). (à gauche) Le contrôle en présence de RSC mais en l'absence d'ATP. Les di-nucléosomes sont majoritairement positionnés comme attendu par les deux séquences positionnantes 601. (à droite) Le résultat du glissement par RSC en présence d'ATP. Les di-nucléosomes ne sont plus positionnés mais ont été glissés par RSC dans différentes configurations.

Une étude plus approfondie des images AFM suggère que les états des di-nucléosomes sont quantifiés et que l'on peut distinguer uniquement 5 types de di-nucléosomes (Figure 140).

- **L'Etat 1** : pour lequel les 2 nucléosomes sont positionnés dans les séquences 601 initiales (état de départ).
- **L'Etat 2** : pour lequel un des nucléosomes est positionné dans la séquence 601 initiale alors que l'autre nucléosome est déplacé au bout du fragment. En fait, plus généralement c'est un état dans lequel un des deux nucléosomes est au bout du fragment alors que l'autre nucléosome possède des bras d'ADN libres de part et d'autre.
- **L'Etat 3** : pour lequel un des nucléosomes est positionné dans la séquence 601 initiale alors que l'autre nucléosome est déplacé au contact de celui-ci.
- **L'Etat 4** : pour lequel chacun des nucléosomes a été déplacé vers le même bout du fragment au contact l'un de l'autre.
- **L'Etat 5** : pour lequel chacun des nucléosomes a été déplacé à une extrémité de part et d'autre du fragment.

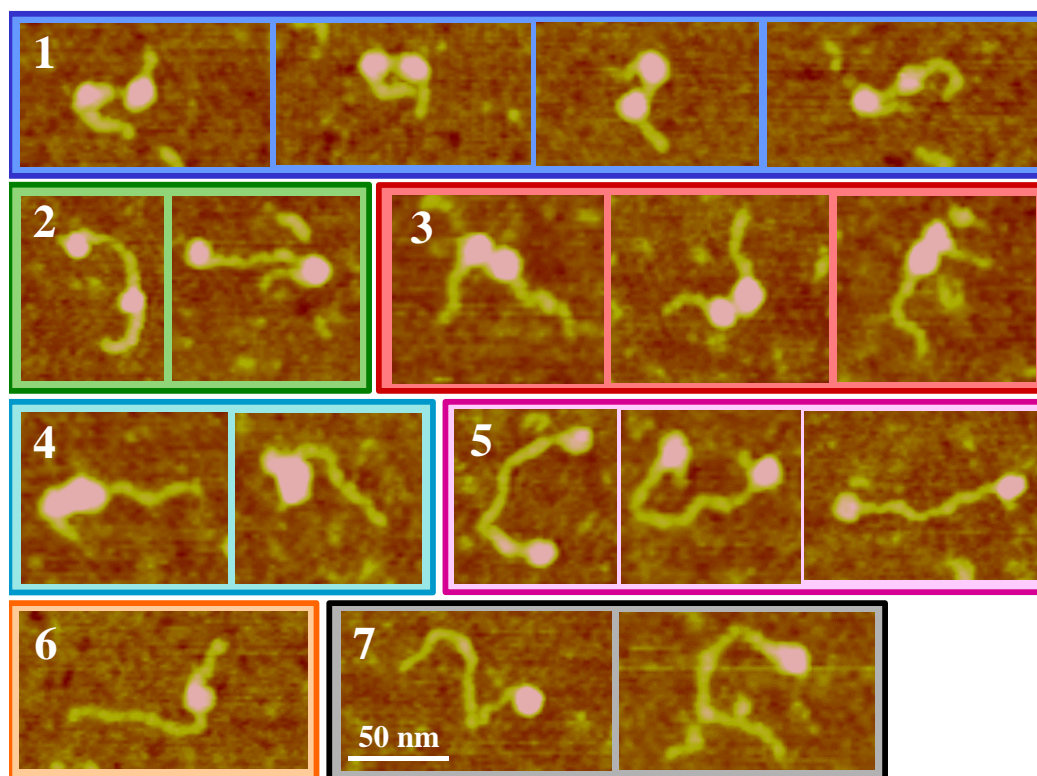


Figure 140 : Les types d'états observés lors de l'action de remodelage par RSC sur des di-nucléosomes positionnés.

Images AFM typiques des différents états des di-nucléosomes et mono-nucléosomes observés lors du remodelage par RSC. On peut distinguer 5 types de di-nucléosomes : les 2 nucléosomes sont positionnés (état 1) ; un des nucléosomes est positionné et le second a été déplacé à l'opposé (état 2) ou vers (état 3) le nucléosome positionné ; les deux nucléosomes ont été déplacés vers une même extrémité (état 4) ou à chaque extrémité du fragment (état 5). On observe 2 sortes de mono-nucléosomes : positionnés (état 6) ou à l'extrémité du fragment (état 7).

Nous avons choisi d'analyser à la main ces images et de ne prendre en compte que dans un premier temps que les di-nucléosomes (et donc de ne pas comptabiliser les mono-nucléosomes). Nous avons compté pour chaque série d'images le nombre de di-nucléosomes appartenant à chacun des 5 états définis plus haut et illustrés sur la Figure 140. Pour ce faire, nous n'avons sélectionné que les objets avec deux NCPs intacts et identifiables. Nous avons appliqué des critères de hauteurs et de longueur complexée basés sur la hauteur des NCPs et la longueur apparente des brins d'ADN libre. Ces critères étant empiriques et pouvant être subjectifs, nous avons systématiquement réalisé ce comptage à deux (ou trois) personnes différentes. L'écart type entre les différentes personnes est $< 5\%$ en moyenne et n'excède pas 10% . Enfin, nous n'avons compté uniquement les di-nucléosomes sans RSC ce qui veut dire que, là encore, on ne s'intéressera ni aux pauses, ni aux pas qui apparaissent lorsque RSC est continûment présent sur le nucléosome, mais seulement aux états produits par RSC et qui subsistent après son détachement.

6.1.2 Titrations, cinétique et évolutions des états

On réalise ces expériences pour différents volumes de RSC à temps d'incubation constant ($\tau_0 = 60$ min) et concentration en ATP constante (1 mM) et on compte environ 1000 di-nucléosomes par condition. Lorsque l'on représente l'évolution de la proportion de chaque état en fonction ici du volume de RSC (Figure 141a), on remarque que, comme attendu, la proportion de l'état 1 décroît jusqu'à 0. On remarque que l'état stationnaire est constitué de l'état 4 et de l'état 5.

Les 2 autres états, 2 et 3, commencent par augmenter avant de diminuer jusqu'à pratiquement disparaître.

De manière naturelle, ceci nous conduit à regrouper les 5 états en 3 groupes : le premier groupe (I) correspondant à l'état initial 1, le second (II) regroupe les états intermédiaires 2 et 3, qui représentent en première approximation⁴ le cas où un nucléosome du di-nucléosome a été déplacé hors du 601 respectivement vers l'extrémité ou vers l'autre nucléosome. Enfin le troisième groupe (III) est composé des deux états stationnaires 4 et 5, pour lesquels les deux nucléosomes ont été déplacés hors de leur séquence positionnantes 601. On peut alors également représenter les données expérimentales en groupant les di-nucléosomes de cette façon, comme nous l'avons fait sur la Figure 141b.

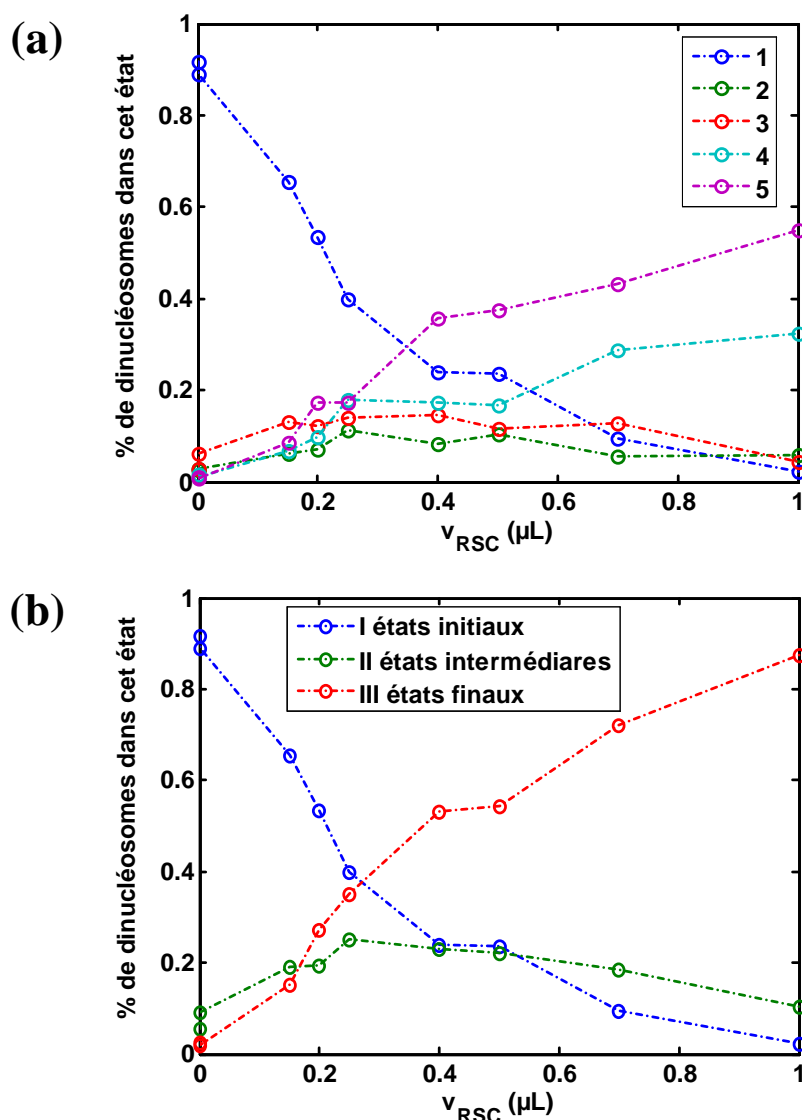


Figure 141 : Evolution de la proportion des différents types de di-nucléosomes au cours du remodelage par RSC

La proportion de di-nucléosomes dans chaque (a) type ou (b) groupe d'états est représenté au cours du remodelage en fonction du volume de RSC et (en bas) pour un temps d'incubation de $\tau_0 = 60$ minutes et $[ATP] = 1$ mM. Pour chaque condition ~1000 di-nucléosomes sont comptés.

⁴ Il est à noter que l'état 2 comporte aussi, comme nous le verrons, des di-nucléosomes où l'un des nucléosomes est positionné à cheval sur une séquence positionnante et l'ADN de liaison.

On réalise le même type d'expérience en faisant varier le temps d'incubation, à volume de RSC ($v_0 = 0.4 \mu\text{L}$) et concentration en ATP (1mM) constants. On remarque alors que si l'on normalise le temps par $\tau_0 = 60 \text{ min}$ et le volume de RSC par $v_0 = 0.4 \mu\text{L}$, il est possible de superposer les évolutions temporelles et la titration (Figure 142). Tout se passe donc comme si le temps et la concentration en moteur étaient des paramètres de contrôle équivalents du point de vue de la coordonnée de réaction.

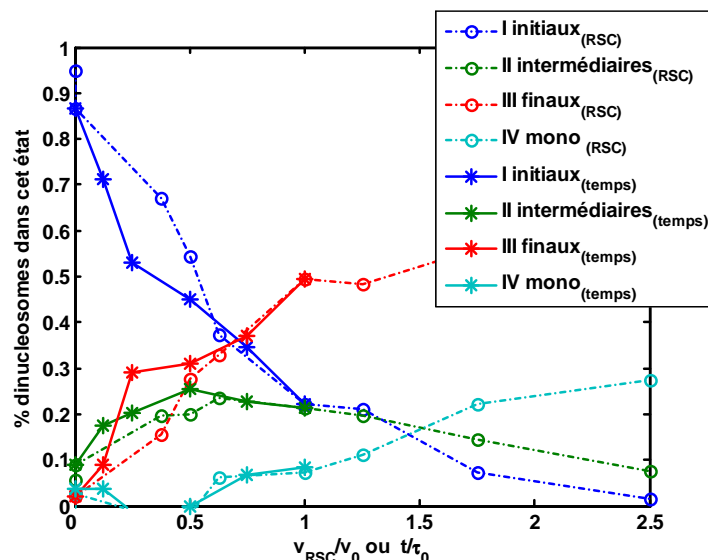


Figure 142 : Superposition de la cinétique et de la titration en RSC de la réaction de remodelage des di-nucléosomes

La proportion de di-nucléosomes dans chaque groupe I (état initial), II (états intermédiaires) et III (états finaux) ainsi que la proportion de mono-nucléosomes au cours de la cinétique (en fonction du temps) et de la titration (en fonction du volume de RSC) par RSC est représentée en renormalisant l'axe des temps par $\tau_0 = 60 \text{ minutes}$ et l'axe des volumes par $v_0 = 0.4 \mu\text{L}$.

Nous verrons par la suite que la bonne superposition de l'évolution temporelle et de la titration peut être interprétée comme le fait que la réaction limitante est le glissement du complexe (nucléosome + moteur).

De l'observation des données expérimentales (Figure 140 et Figure 141), on tire les premiers ingrédients mécanistiques suivants :

1. Le fait que les états soient nettement quantifiés et que l'état stationnaire soit composé des états 4 et 5 signifie que dans l'état stationnaire la seule action du moteur consiste à faire passer les di-nucléosomes de 4 vers 5 et inversement, sans s'arrêter dans une position intermédiaire. L'action du moteur sur un nucléosome est donc processive sur une longueur d'au moins 200 pb qui constitue la distance d'ADN à parcourir pour transiter entre ces deux états.
2. Dans l'état stationnaire la proportion relative de chacun des deux états est du même ordre de grandeur (cf. Figure 141). Ceci montre que le mouvement du complexe moteur+nucléosome est quasi-isotrope. Il n'est pas dirigé uniquement (ou très majoritairement) soit vers une extrémité libre du fragment d'ADN soit vers l'autre nucléosome.
3. Enfin, toujours du fait de la composition de l'état stationnaire, le mouvement du complexe moteur+nucléosome paraît peu influencé par la présence des séquences positionnantes. On aurait pu en effet s'attendre à ce que le gain énergétique lié à la présence du nucléosome dans la séquence positionnante 601 puisse arrêter le déplacement. Le fait que, dans l'état stationnaire on n'observe plus de di-nucléosomes avec au moins l'un des deux nucléosomes dans le 601, montre que la processivité du complexe moteur+nucléosome ne semble pas être affectée par le passage dans une séquence fortement positionnante.

En conclusion, à ce stade on peut dire que le complexe RSC+nucléosome est processif, quasi-isotrope et peu influencé par les effets de séquence. Néanmoins, de part notre approche (ou de part nos conditions d'analyse), nous ne pouvons pas exclure qu'il existe des pauses ou des allers-retours supplémentaires du complexe RSC+nucléosome lors du déplacement si ces pauses ne conduisent pas au décrochage du moteur.

6.1.3 De la modélisation à la construction d'un schéma cinétique

A l'aide des observations précédentes nous allons maintenant construire, étape par étape, un modèle susceptible de prédire l'évolution des différents états au cours du temps et lors de la titration. Dans un premier temps nous utiliserons une simulation numérique discrète qui nous permettra de mettre en évidence simplement le caractère séquentiel du déplacement et le cas particulier des nucléosomes glissés au bout du fragment. Ensuite, nous utiliserons un modèle de 'chaînes de Markov' qui nous permettra d'affiner la détermination des taux de transfert.

6.1.3.1 Construction d'une simulation numérique simple

Nous avons construit une simulation numérique basée sur les ingrédients 1), 2) et 3) présentés ci-dessus (section 6.1.2). On crée un réseau discret 1D à 202 cases ($L_{tot}-2 \times 147$) sur lequel on pose deux sphères dures ponctuelles sans interaction à distances représentant les deux nucléosomes et pouvant occuper les positions 1 à 194 du réseau (cf. construction du di-nucléosome sur la Figure 138). On considère donc les nucléosomes comme des objets ponctuels contenant 147pb d'ADN. Au départ on place deux nucléosomes aux positions 81 et 131. D'après les données structurales connues, RSC n'est capable de se fixer qu'à un seul nucléosome (Leschziner *et coll.* 2007) nous supposons que donc le choix initial du nucléosome au sein du di-nucléosome est aléatoire. Enfin, nous faisons l'hypothèse du fait des symétries du nucléosome que la directionnalité du déplacement ne dépend pas de la position de départ ou d'arrivée. Le glissement est donc isotrope.

Pour les différents modèles testés, en accord avec les ingrédients précédents le complexe moteur+nucléosome ne se dissocie que lorsqu'il rencontre soit une extrémité du fragment d'ADN soit un autre nucléosome (processivité et absence d'effets de séquence sur le déplacement). Donc, à chaque événement sur un di-nucléosome, correspond une itération de la simulation. Chaque itération regroupe les étapes suivantes décrites sur la Figure 143 :

- On choisit aléatoirement l'un des deux mobiles ($p_1 = p_2 = 0.5$) qui sera la cible du moteur.
- On choisit avec une probabilité $p_{\text{glissement}}$ si cette action sera productive ou non ($p_{\text{décrochage}} = 1 - p_{\text{glissement}}$). Cette probabilité de glissement peut être vue comme la probabilité pour le moteur de se lier efficacement au nucléosome considéré. Dans le cas le plus simple nous choisirons $p_{\text{glissement}} = 1$ puis nous ferons varier cette probabilité en fonction de la position du nucléosome (ou de son environnement).
- Dans le cas où le moteur est actif on détermine alors aléatoirement la direction du glissement. ($p_- = p_+ = 0.5$).
- Le moteur est susceptible de pouvoir poursuivre son action sur un deuxième nucléosome avec une probabilité $p_{\text{séquentiel}}^5$.

⁵ Nous testerons deux cas : le cas où la deuxième action est systématiquement appliquée au deuxième nucléosome du di-nucléosome et celui où on laisse le choix du nucléosome qui subit la deuxième action (avec une probabilité $p_{\text{change_nuc}}$).

Après cette séquence, le moteur se décroche et l'itération suivante est constituée des mêmes étapes. Selon la valeur de $p_{\text{séquentiel}}$ on peut donc avoir deux mouvements par itération.

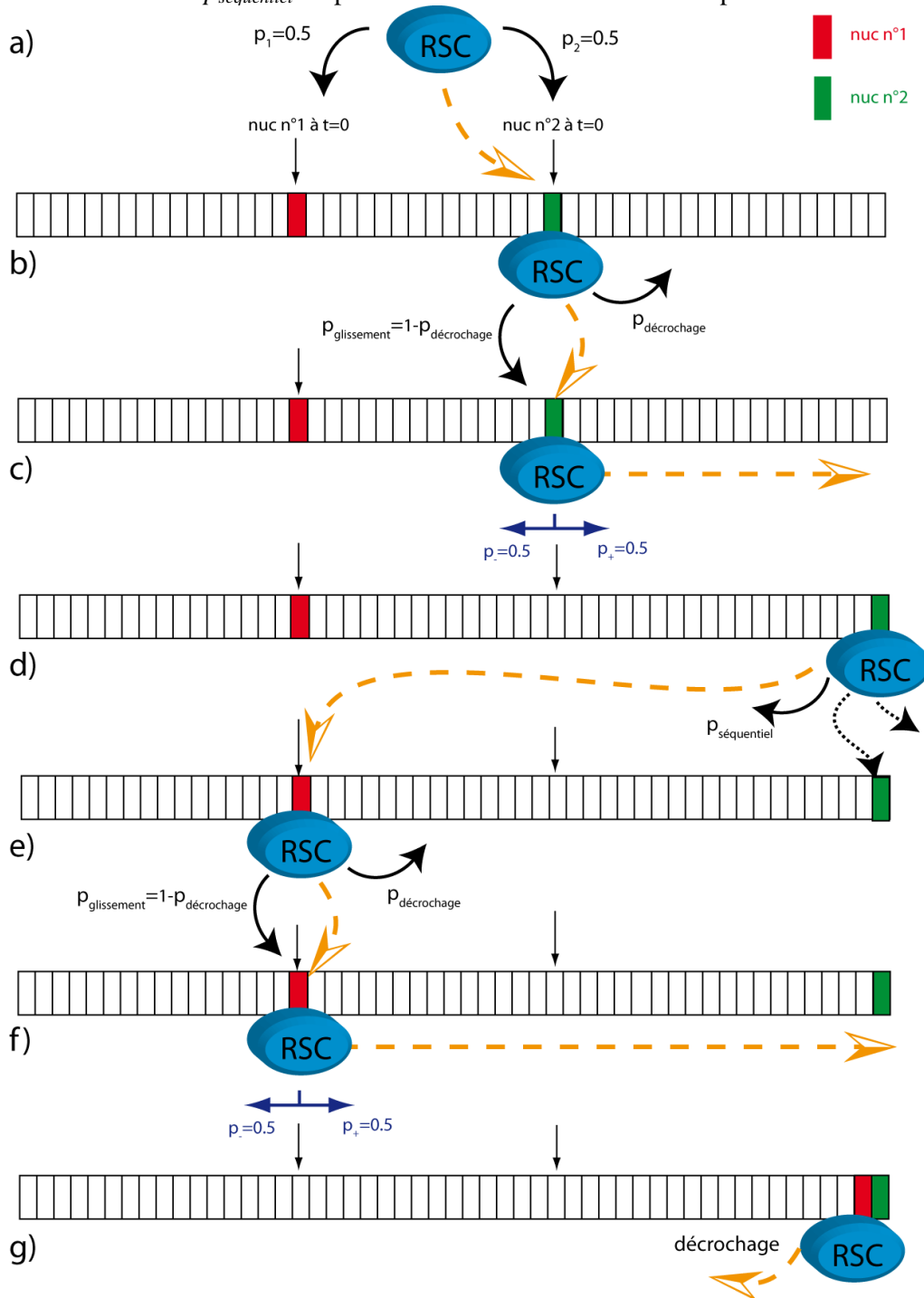


Figure 143 : Description des différentes étapes de la simulation à chaque itération

(a) On choisit le nucléosome qui va subir l'action de RSC à l'intérieur du di-nucléosome considéré avec une probabilité ($p_1 = p_2 = 0.5$). (b) Pour le nucléosome considéré, le moteur a une probabilité $p_{\text{glissement}}$ d'effectuer un déplacement du nucléosome et une probabilité $p_{\text{décrochage}} = 1 - p_{\text{glissement}}$ de se décrocher. (c) La direction du mouvement est choisie avec une probabilité ($p_+ = p_- = 0.5$). (d) RSC a une probabilité $p_{\text{séquentiel}}$ d'effectuer une seconde action sur un nucléosome du di-nucléosome. (e) Comme précédemment le moteur a une probabilité $p_{\text{glissement}}$ d'effectuer un déplacement (f) On choisit à nouveau la direction du mouvement avec une probabilité ($p_+ = p_- = 0.5$). (f) Après cette éventuelle seconde action, RSC se décroche.

Si l'on applique les règles de la simulation que l'on vient d'énumérer à un di-nucléosome dans l'état 1, on obtient 6 états distincts parmi lesquels on retrouve les 5 états observés expérimentalement. Plus précisément, les états 2 et 2^{bis} confondus expérimentalement sont ici distincts. On peut, là encore, grouper les états observés en trois groupes représentant les états initiaux (I), intermédiaires (II) et finaux (III). De plus, les règles de la simulation permettent de construire les transitions autorisées entre les différents états. Le schéma cinétique complet est représenté sur la Figure 144.

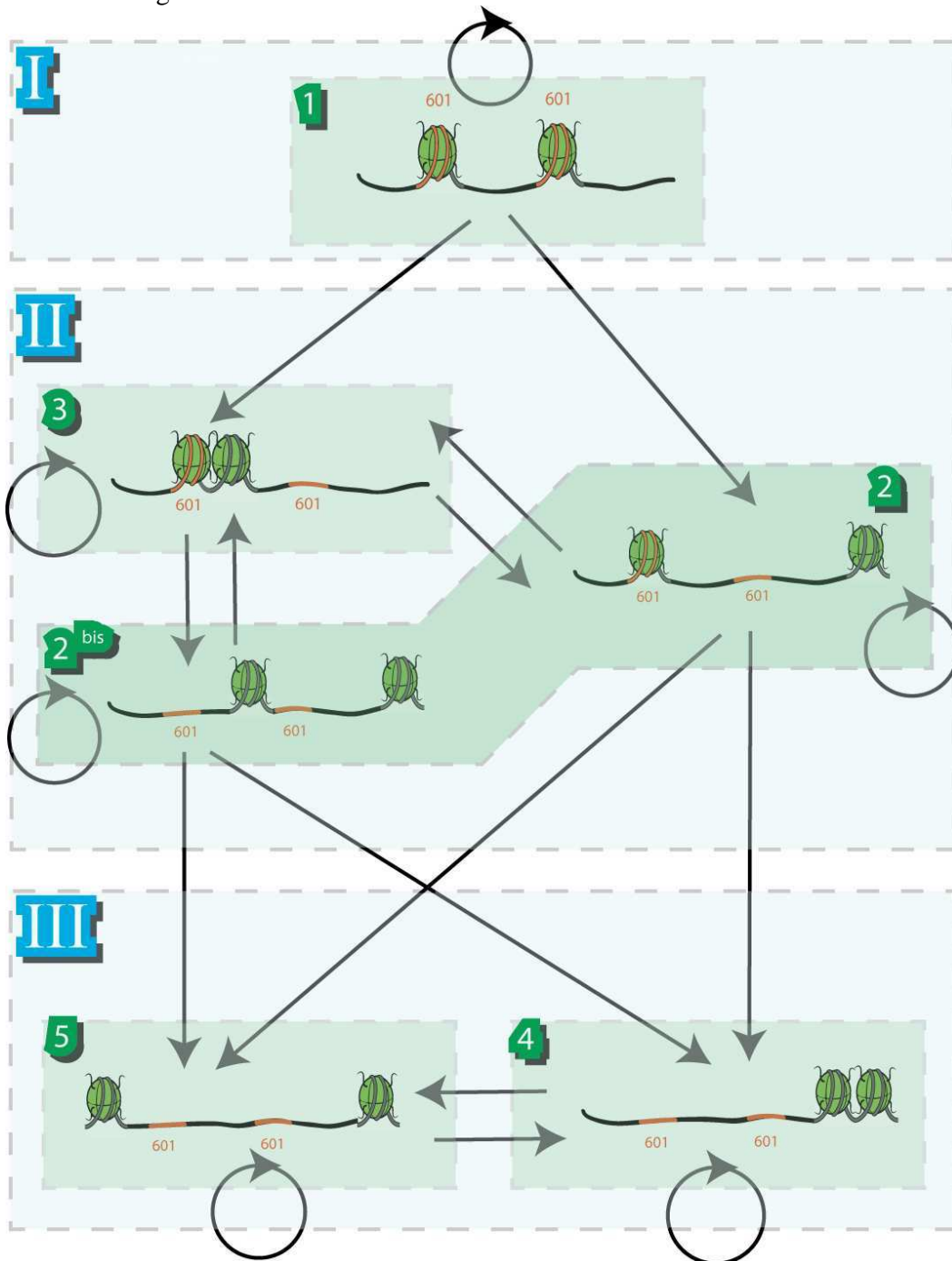


Figure 144 : Schéma cinétique général rendant compte de la simulation décrite

Nous avons construit un arbre cinétique avec les états et les transitions autorisées à partir des règles générales de la simulation appliquées à un di-nucléosome positionné. Les flèches circulaires correspondent à des itérations où l'état du di-nucléosome est inchangé. La position des séquences positionnantes 601 est indiquée en rouge mais n'est pas à l'échelle.

Pour confronter les résultats des différentes simulations que nous pouvons effectuer aux données expérimentales, il est nécessaire au préalable d'établir la relation entre la coordonnée réactionnelle de la simulation et celles de l'expérience.

6.1.3.1.1 Relation entre les coordonnées réactionnelles de la simulation et de l'expérience

Pour pouvoir relier le nombre de mouvements dans la simulation à la durée t de l'expérience (ou la concentration en moteurs), nous devons choisir quelle est l'étape cinétiquement limitante. D'après la littérature, il apparaît naturel de considérer que c'est l'action du moteur (remodelage ou glissement) qui est limitante et non pas la liaison du moteur, celle de l'ATP, la dissociation de l'ADP ou le temps de diffusion en solution du moteur (Narlikar *et coll.* 2001).

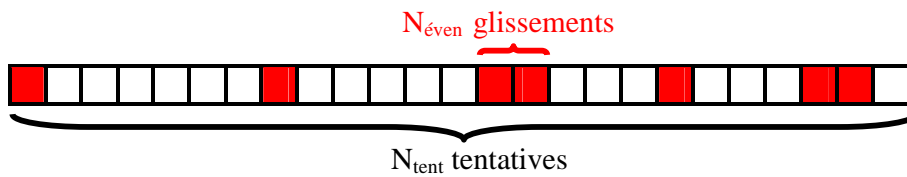
Considérons maintenant cette réaction enzymatique de glissement pour un nucléosome donné:



On a vu expérimentalement que le nucléosome glissé représente lui aussi un substrat pour le glissement par l'enzyme (ce qui revient implicitement à boucler le schéma cinétique). Faisons l'hypothèse que cette réaction peut être décrite par une unique étape et soit $N_{éven}$ le nombre de glissements effectivement réalisés par ce nucléosome entre 0 et t (durée de l'expérience) et N_{tent} le nombre de tentatives de glissement. A chaque tentative, la probabilité moyenne p de glissement pour notre nucléosome est alors $p = \langle N_{éven} \rangle / N_{tent}$ où $\langle N_{éven} \rangle$ est le nombre moyen de glissements sur une population de nucléosomes après N_{tent} .

Pour un nucléosome donné quelle est alors probabilité d'être glissée n fois entre 0 et t ? Autrement dit, quelle est la distribution de probabilité du nombre de glissements $P(N_{éven} = n)$ au temps t ?

Comme on le voit sur le schéma suivant les configurations possibles correspondent aux différentes combinaisons de cases rouges (événements réussis) et cases blanches (événements avortés) dans l'ensemble des cases possibles.



On peut montrer simplement que la distribution de probabilité $P(N_{éven} = n)$ est alors donnée par une loi de Bernoulli :

$$P(N_{éven} = n) = C_{N_{tent}}^n p^n (1-p)^{N_{tent}-n}$$

Dans la limite des grands nombres d'évènements, ($p \ll 1$ et $N_{tent} \gg 1$), on peut approximer une loi de Bernoulli par une loi de poisson :

$$P(N_{éven} = n) = \frac{e^{-pN_{tent}} (pN_{tent})^n}{n!}$$

de moyenne $\langle N_{éven} \rangle = pN_{tent}$.

Calculons maintenant, N_{tent} . Si l'on suppose que l'étape limitante est l'action de glissement par elle-même et non pas la fixation du moteur ou de l'ATP, on a alors $N_{tent} = N_c \cdot \Phi_t$ où N_c est le

nombre moyen de complexes formés et Φ_t le nombre de fois ou le complexe est actif entre 0 et t . En écrivant l'équilibre d'association-dissociation du complexe il vient alors :

$$N_c = V \cdot K \cdot [\text{Nucléosome}] \cdot [\text{RSC}]$$

où K est la constante d'équilibre d'association-dissociation.

Supposons que l'action du moteur peut être décomposée en trois phases : la diffusion libre ($t_{\text{diffusion}}$), l'attente sous forme de complexe (t_{attente}) et le glissement ($t_{\text{glissement}}$). On estime le temps de diffusion du moteur $t_{\text{diffusion}} \sim \text{ms}$, donc très petit devant ($t_{\text{attente}} + t_{\text{glissement}}$), qui représentent l'étape cinétiquement limitante :

$$\phi_t = \frac{t}{\langle t_{\text{diffusion}} \rangle + \langle t_{\text{attente}} \rangle + \langle t_{\text{glissement}} \rangle} \sim \frac{t}{\langle t_{\text{attente}} \rangle + \langle t_{\text{glissement}} \rangle}$$

En outre, t_{attente} et $t_{\text{glissement}}$ sont à priori une donnée du moteur et ne dépendent ni de la concentration en moteurs ni du temps. Finalement on a,

$$N_{\text{tent}} = \frac{V \cdot K \cdot [\text{nuc}] \cdot [\text{RSC}] \cdot t}{\langle t_{\text{attente}} \rangle + \langle t_{\text{glissement}} \rangle}$$

Par conséquent, $P(N_{\text{even}}=n)$ est une loi de poisson dont la moyenne est proportionnelle au produit $[\text{nuc}] \cdot [\text{RSC}] \cdot t$.

Pour N_{tent} donné, on a donc une dispersion du nombre de mouvements N_{even} donné par $P(N_{\text{even}} = n)$. Autrement dit, on aboutit à une désynchronisation des mouvements pour les différents di-nucléosomes du pool. Dans la simulation ceci se traduit pour une durée de réaction donnée et pour un di-nucléosome donné, par un nombre de mouvements effectués donné par la distribution poissonnienne dont la moyenne croît linéairement avec la durée de la réaction et la concentration en moteur. Il reste à ajuster le coefficient de proportionnalité entre théorie et expérience en faisant correspondre les décroissances théoriques et expérimentales de l'état initial (état 1 ou I dans le cas des états groupés).

En résumé, nous venons de montrer d'une part, que pour un ensemble de moteurs la distribution du nombre de mouvements est une loi de poisson mais aussi que dans cette hypothèse le temps et la concentration en moteur sont des grandeurs équivalentes du point de vue de la coordonnée de réaction ce qui rend compte de nos résultats expérimentaux (Figure 142).

6.1.3.1.2 Le modèle le plus simple : isotrope, iso-productif et non séquentiel

Le premier modèle que nous avons testé est un modèle isotrope dont tous les événements sont productifs de la même manière (iso-productifs). C'est le modèle le plus simple auquel on peut penser puisque les nucléosomes sont considérés comme équivalents entre eux ($p_1 = p_2 = 0.5$) tout comme les directions de glissement ($p_- = p_+ = 0.5$). Comme il n'y a pas de pauses ou d'événements non productifs ($p_{\text{glissement}} = 1$), le moteur se décroche après chaque glissement d'un nucléosome du di-nucléosome ($p_{\text{séquentiel}} = 0$).

Nous avons réalisé cette simulation sur un ensemble de 5000 di-nucléosomes positionnés et nous avons, comme expliqué dans la section 6.1.3.1.1, ajusté le paramètre 'temps' des courbes expérimentales et théoriques pour la décroissance de l'état initial.

En regroupant les différents états comme précédemment en 3 groupes : les états initiaux (I), intermédiaires (II) et finaux (III), on obtient trois évolutions ayant la même allure que les données expérimentales (Figure 145).

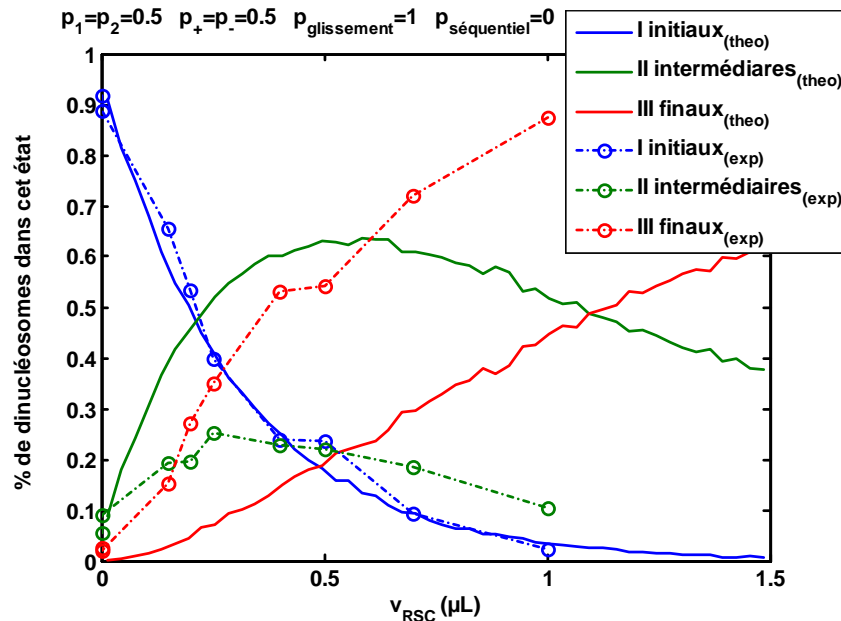


Figure 145 : Simulation avec le modèle simple isotrope et iso-productif

Données expérimentales (en symboles et traits pointillés) et simulation (en traits pleins) de l'évolution de la proportion de di-nucléosomes dans les états groupés initiaux (I), intermédiaires (II) et finaux (III). Le modèle le plus simple suppose que les nucléosomes ($p_1 = p_2 = 0.5$) et les directions de glissement ($p_+ = p_- = 0.5$) sont équivalents, que les événements sont iso-productifs ($p_{glissement} = 1$) et que le moteur se décroche après chaque glissement ($p_{séquentiel} = 0$).

Néanmoins, il apparaît que la proportion des états intermédiaires (II) est systématiquement surestimée dans ce type de modèle. Comme nous avons imposé le seul paramètre libre du modèle (la vitesse de décroissance de l'état I), il apparaît qu'une modélisation de ce type ne permet pas de rendre compte des données expérimentales.

6.1.3.1.3 Les modèles séquentiels

Pour résoudre cette inadaptation du modèle, il faut donc favoriser la formation de l'état III au dépend de l'état II. Nous avons choisi de modifier le schéma cinétique établi précédemment (Figure 144) pour obtenir un schéma cinétique autorisant le passage de l'état I à l'état III directement (Figure 146). Pour cela, nous avons choisi d'autoriser deux mouvements consécutifs par pas de temps dans la simulation (modèle séquentiel) avant le décrochage du moteur. Nous aurons donc $p_{séquentiel} \neq 0$.



Figure 146 : Modification du schéma cinétique établi sur la Figure 144

Afin de rendre compte des données expérimentales, il est nécessaire de favoriser la formation de l'état III au dépend de l'état II. Pour ce faire, nous autorisons dans ce nouveau schéma cinétique adapté de celui présenté sur la Figure 144, le passage de l'état I à l'état III directement en autorisant deux mouvements consécutifs ($p_{séquentiel} \neq 0$) avant le décrochage du moteur.

Dans un premier temps, $p_{séquentiel}$ correspond à la probabilité pour RSC d'exercer une action sur le second nucléosome du di-nucléosome à la suite de son action sur le premier. Le moteur a une probabilité $1 - p_{séquentiel}$ de se décrocher après sa première action.

Les simulations sont réalisées pour les mêmes paramètres ($p_1 = p_2 = p_- = p_+ = 0.5$ et $p_{\text{glissement}} = 1$) que le modèle simple précédent (donc toujours isotrope et iso-productif) et avec différentes valeurs de $p_{\text{séquentiel}}$. Comme on le voit sur la Figure 147, pour $p_{\text{séquentiel}} < 1$ il n'y a pas un bon accord entre théorie et expériences alors que pour $p_{\text{séquentiel}} = 1$, la courbe expérimentale représentant l'évolution au cours de la titration par RSC de la proportion de di-nucléosomes dans les états intermédiaires groupés (II) se superpose à celle de la simulation.

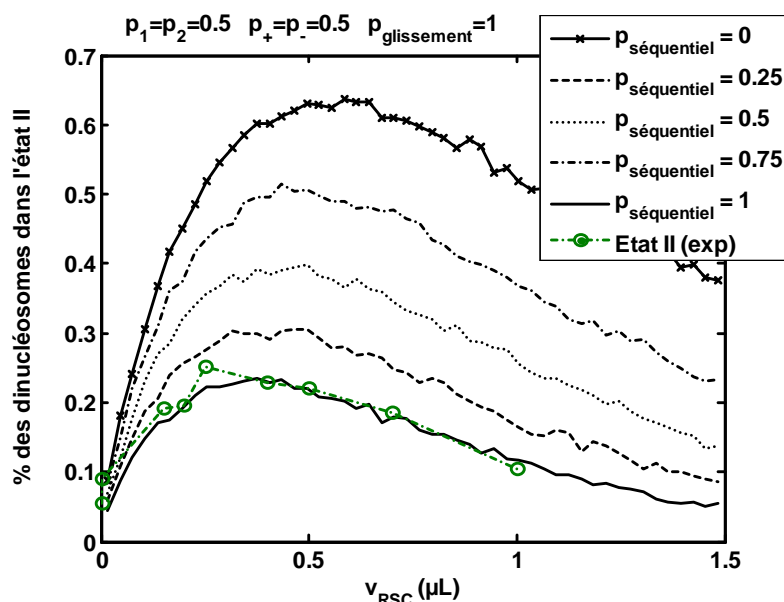


Figure 147 : Comparaison des simulations pour plusieurs paramètres de $p_{\text{séquentiel}}$

Ce graphe reproduit l'évolution, au cours du glissement par RSC, de la proportion des di-nucléosomes dans les états intermédiaires (II) pour les expériences (ronds verts) et pour la simulation. On utilise un modèle isotrope ($p_- = p_+ = 0.5$), iso-productif ($p_{\text{glissement}} = 1$) et avec différentes probabilités ($p_{\text{séquentiel}}$ varie de 0 à 1) d'avoir une action séquentielle (ou $1 - p_{\text{séquentiel}}$ de se décrocher du di-nucléosome). On remarque que les données expérimentales sont compatibles uniquement avec la simulation supposant une action à 100 % séquentielle de RSC ($p_{\text{séquentiel}} = 1$).

Nous comparons maintenant l'ensemble des données expérimentales groupées (Figure 148a) et dégroupées (Figure 148b) avec la simulation basée sur le modèle à 100 % séquentiel ($p_{\text{séquentiel}} = 1$). On retrouve le bon accord de la simulation avec les données des états groupés (I, II et III), mais la situation est plus complexe en ce qui concerne les données dégroupées (Figure 148). On observe une bonne adéquation pour les états 1, 2 et 3 mais la proportion relative des états 4 et 5 semble inversée entre les données et la simulation. Tout se passe donc comme si ce modèle permettait de rendre compte de l'évolution de chaque groupe (états initiaux, intermédiaires et finaux) mais ne suffisait pas pour expliquer leur dynamique interne et en particulier celle de l'état stationnaire.

L'ingrédient de séquentialité semble donc important pour expliquer nos mesures AFM. Dans le même contexte, on peut penser à un autre type de modèle séquentiel dans lequel le moteur n'est pas obligé de travailler sur l'autre nucléosome du di-nucléosome après sa première action, mais est susceptible d'effectuer à nouveau une action sur le même objet avec une certaine probabilité. Le modèle est donc à 100% séquentiel dans le sens où le décrochage de RSC du di-nucléosome n'est plus permis entre les deux actions, mais il existe maintenant une probabilité $p_{\text{change nuc}}$ de passer à l'autre nucléosome et $1 - p_{\text{change nuc}}$ de rester sur le même nucléosome et de le déplacer à nouveau une seule fois. Pour tester cette hypothèse nous avons réalisé une autre simulation en faisant varier ce paramètre $p_{\text{change nuc}}$ de 0 à 1.

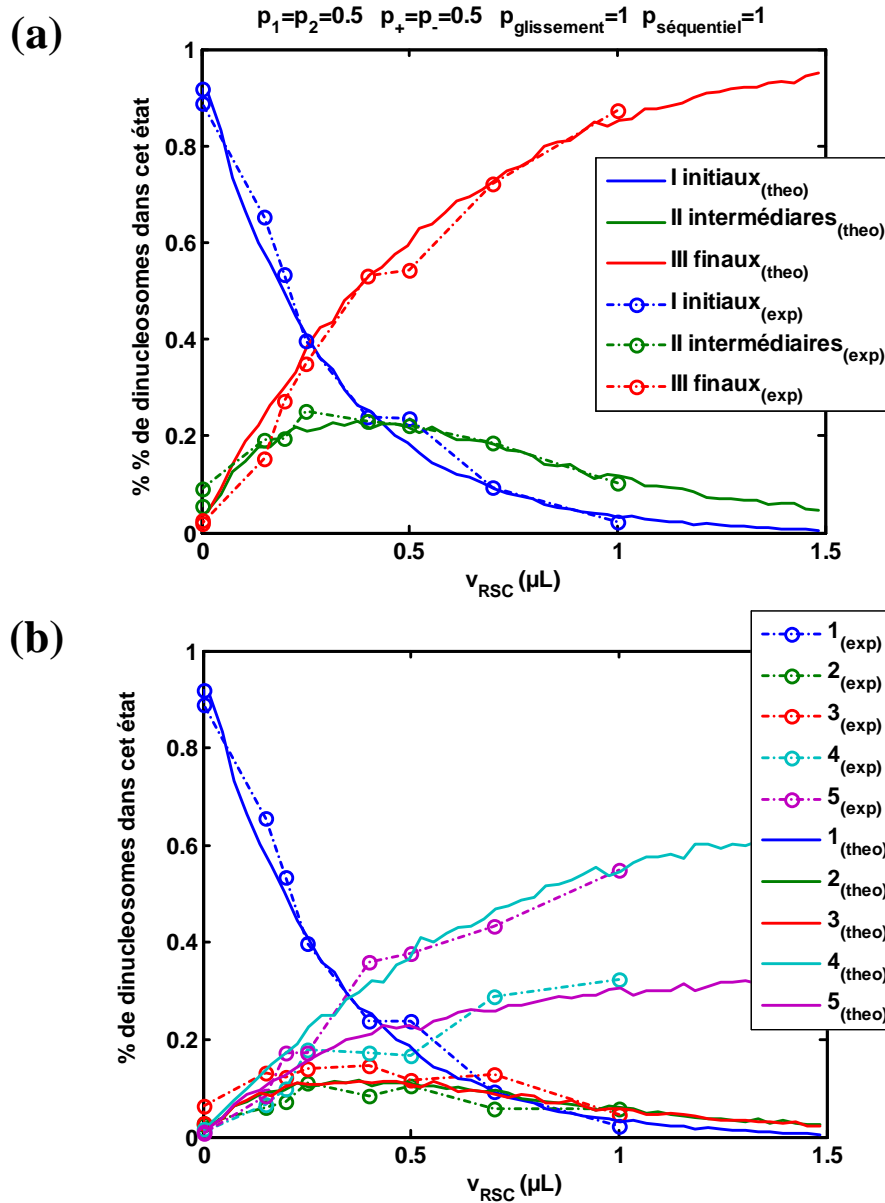


Figure 148 : Comparaison des données expérimentales avec la simulation basée sur le modèle isotrope, iso-productif et séquentiel.

Comparaison des données expérimentales (en symboles et traits pointillés) et simulées (en traits pleins) pour (a) les états groupés (états I, II et III) et (b) les états dégroupés (états 1 à 5). La simulation est basée sur le modèle isotrope ($p_+ = p_- = 0.5$), iso-productif ($p_{glissement} = 1$) et 100 % séquentiel ($p_{séquentiel} = 1$). On observe un bon accord entre théorie et expériences pour les états groupés, et pour certains états dégroupés (1, 2 et 3) alors que les états 4 et 5 semblent inversés en proportion dans la simulation par rapport aux données expérimentales.

Nous avons représenté sur la Figure 149 l'évolution de la proportion de di-nucléosomes dans l'état II pour différentes valeurs de ce paramètre $p_{change\ nuc}$ entre 0 et 1. On remarque que la seule valeur de la probabilité qui permet de rendre compte des données expérimentales est $p_{change\ nuc} = 1$. A nouveau, pour expliquer les données groupées, il est nécessaire de considérer que les deux mouvements séquentiels sont réalisés sur des nucléosomes différents du même di-nucléosome.

On peut remarquer également une grande ressemblance entre la Figure 147 et la Figure 149, qui correspondent à faire varier dans la simulation respectivement $p_{séquentiel}$ et $p_{change\ nuc}$. C'est à dire

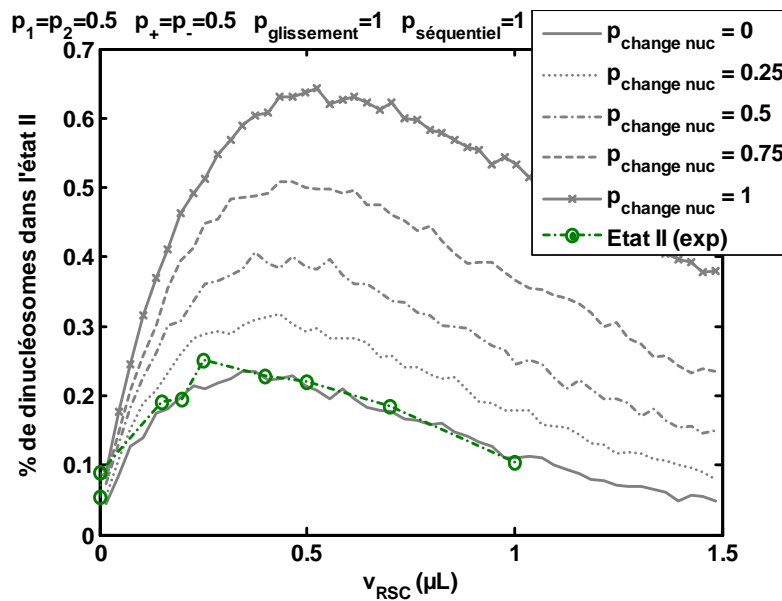


Figure 149 : Comparaison des simulations pour plusieurs paramètres de $p_{\text{change nuc}}$

Ce graphe reproduit l'évolution, au cours du glissement par RSC, de la proportion des di-nucléosomes dans les états intermédiaires (II) pour les expériences (ronds verts) et pour la simulation. On utilise modèle isotrope ($p_+ = p_- = 0.5$), iso-productif ($p_{\text{glissement}} = 1$), séquentiel ($p_{\text{séquentiel}} = 1$) et avec différentes probabilités ($p_{\text{change nuc}}$ varie de 0 à 1) de changer de nucléosome pour la seconde action après avoir glissé le premier nucléosome du di-nucléosome. On remarque que les données expérimentales sont compatibles uniquement avec la simulation supposant un changement de nucléosome dans 100 % des cas ($p_{\text{change nuc}} = 1$).

que l'on obtient la même série de courbes simulées si l'on fait varier la probabilité que l'action du moteur soit séquentielle sur les deux nucléosomes du di-nucléosome avant de se décrocher ou la probabilité de changer de nucléosome après la première action, la deuxième ayant toujours lieu. Tout se passe donc comme si, à chaque itération, autoriser une plus grande probabilité d'un mouvement du deuxième nucléosome (augmenter $p_{\text{séquentiel}}$) était équivalent à rendre plus probable le choix du deuxième nucléosome après une action sur le premier (augmenter $p_{\text{change nuc}}$ avec $p_{\text{séquentiel}} = 1$). Autrement dit, après la première action, et du point de vue des états groupés, ne rien faire ou s'occuper du même nucléosome du di-nucléosome est équivalent (ce que l'on peut facilement comprendre puisque cela revient à rester dans un état appartenant au même groupe).

Pris ensemble, les résultats de ces deux modèles séquentiels permettent de montrer que pour un modèle isotrope et processif, il est nécessaire de supposer une séquentialité particulière du mouvement c'est à dire qu'après avoir glissé un des nucléosomes du di-nucléosome, le moteur glisse l'autre nucléosome.

Néanmoins comme nous l'avons vu également ce type de modèle simple ne permet pas de rendre compte des données dégroupées ; il est donc nécessaire de permettre un plus grand degré de liberté à notre modèle, c'est ce que nous proposons de faire maintenant en tenant compte de l'environnement du nucléosome qui doit être glissé par RSC.

6.1.3.1.4 Les modèles quasi-isotropes ou non iso-productifs

Pour affiner, notre modèle nous allons supposer que la probabilité de glissement $p_{\text{glissement}}$ n'est plus la même⁶ pour tous les nucléosomes. En effet, d'après la comparaison de notre

⁶ Nous n'avons pas explicité le cas où $p_{\text{glissement}} \neq 1$ mais identique pour tous les nucléosomes, car il correspond à une simple renormalisation du temps.

‘meilleure’ simulation avec les données expérimentales (Figure 148b), il apparaît que les di-nucléosomes dans l’état 5 (un nucléosome à chaque extrémité du fragment) sont plus nombreux dans l’état stationnaire que ne le supposerait un modèle isotrope et sans effet de bord. Deux hypothèses peuvent être proposées : soit l’efficacité de glissement d’un nucléosome positionné à l’extrémité du fragment est plus faible, soit le mouvement de glissement vers l’extrémité est plus favorable que les autres types de glissement.

Testons tout d’abord la première hypothèse : pour ce faire, supposons que les nucléosomes positionnés à l’extrémité ne sont glissés qu’avec une probabilité $p_{\text{glissement_bout}} < 1$, les autres positions du nucléosomes conduisant à un glissement productif ($p_{\text{glissement_autre}} = 1$). En gardant un modèle isotrope ($p_- = p_+ = 0.5$) et séquentiel ($p_{\text{séquentiel}} = 1$) il apparaît que pour $p_{\text{glissement_bout}} = 0.2$, l’évolution des états groupés (non montrée) et dégroupés (Figure 150) sont bien décrit par ce modèle. En particulier, la proportion relative des états 4 et 5 est, cette fois, identique pour la simulation et les expériences tout au long de la réaction de remodelage par RSC.

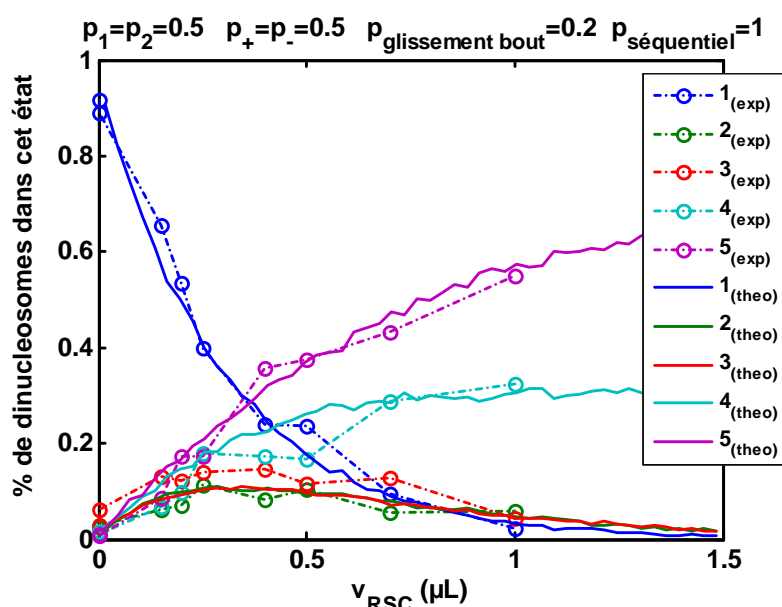


Figure 150 : Comparaison des données expérimentales avec la simulation basée sur le modèle isotrope, séquentiel et non iso-productif

Comparaison des données expérimentales (en symboles et traits pointillés) et simulées (en traits pleins) pour les états dégroupés (états 1 à 5) au cours de la titration de la réaction de remodelage des di-nucléosomes par RSC. La simulation est basée sur le modèle isotrope ($p_- = p_+ = 0.5$), séquentiel ($p_{\text{séquentiel}} = 1$) et non iso-productif ($p_{\text{glissement_autre}} = 1$ pour toutes les positions du nucléosomes sauf l’extrémité pour laquelle on a $p_{\text{glissement_bout}} = 0.2$). On observe un bon accord entre théorie et expériences pour tous les états dégroupés, et en particulier la proportion relative des états 4 et 5 dans l’état stationnaire.

Considérons maintenant que $p_{\text{glissement}} = 1$ pour toutes les positions du nucléosome (même l’extrémité) mais que les transitions dirigées vers les bouts du fragment sont favorisées, et celle visant à en sortir sont défavorisées. Dans la simulation cela revient à utiliser p_+ ou $p_- > 0.5$ lorsqu’il s’agit de se déplacer vers le bout et p_+ ou $p_- < 0.5$ lorsqu’il s’agit d’en sortir. Dans ce cas, on trouve également un bon accord avec les données expérimentales (données non présentées). Ceci revient à dire que l’on peut aussi reproduire les données en supposant un caractère non-isotrope local pour l’action du moteur.

Cependant, cette hypothèse non-isotrope paraît plus difficile à interpréter dans le cadre du mécanisme d’action de RSC. Il nous semble donc que l’interprétation d’une efficacité de glissement différente pour les nucléosomes positionnés à l’extrémité de l’ADN soit la meilleure. En effet, le

caractère non isotrope du déplacement pour les nucléosomes positionnés au bout du fragment supposerait que le moteur soit capable de reconnaître de tels nucléosomes et d'adapter sa directionnalité en fonction de cela. Il paraît plus simple d'imaginer que la fixation du moteur ou l'efficacité de glissement est plus basse pour des nucléosomes en position extrême.

Nous avons donc montré qu'un modèle dans le lequel RSC est considéré comme un moteur moléculaire processif, isotrope, non iso-productif et séquentiel à chaque pas de temps permet de rendre compte de nos données expérimentales. L'intérêt de ce modèle est qu'il ne possède qu'un seul paramètre véritablement libre⁷ qui est l'efficacité du moteur à déplacer un nucléosome placé à l'extrémité. On peut interpréter la valeur $p_{\text{glissement_bout}} = 0.2$ de différentes manières : soit, elle représente une constante de liaison plus basse ($k_{ON \text{ bout}} < k_{ON \text{ normal}}$) pour ces nucléosomes soit, elle représente une efficacité de remodelage plus basse lorsque le nucléosome ne possède qu'un bras d'ADN. Dans les deux cas, nos résultats montrent que le moteur semble moins efficace pour remodeler et/ou glisser ces nucléosomes particuliers.

6.1.3.2 Chaînes de Markov et ajustement des paramètres

A l'aide de la simulation, nous avons pu mettre en exergue les paramètres nécessaires pour la construction d'un modèle décrivant les données. Néanmoins cette méthode de simulation ne nous permet pas d'éliminer véritablement la possibilité de modèles non séquentiels plus complexes rendant compte eux aussi des données (non isotropie locale, affinité particulière). Pour s'en assurer, nous avons donc construit un modèle similaire utilisant des chaînes de Markov. Reposant sur les mêmes hypothèses, cette méthodologie nous permettra d'ajuster les paramètres de notre modèle sans intervention de l'utilisateur.

Les chaînes de Markov représentent une autre manière de réaliser un modèle numérique de l'expérience de glissement. Elles sont basées sur l'hypothèse (tacite dans la précédente simulation) que les probabilités de transition k_{ij} d'un état i à un état j entre les temps t et $t+1$ sont indépendantes de t .

Dans la pratique, pour une échelle des temps discrète, on a donc $P_i(t+1)$ la probabilité d'être dans l'état i au temps $t+1$:

$$P_i(t+1) = P_i(t) + \sum_j k_{ji} P_j(t) - \sum_j k_{ij} P_i(t)$$

où les k_{ij} sont les probabilités de transition de l'état i à l'état j . On peut aussi écrire cette relation sous la forme :

$$P(t+1) = M \cdot P(t)$$

où P est le vecteur (P_0, \dots, P_N) représentant la probabilité de chaque état au temps t et $M = (k_{ij})$ est la matrice des probabilités de transition entre ces états. Ce qui implique, par récurrence :

$$P(t+1) = M^t \cdot P(0)$$

Cette représentation permet donc de calculer de manière exacte l'évolution du système connaissant la matrice de transition M et d'ajuster les paramètres k_{ij} à l'aide d'un algorithme d'optimisation.

Dans ce but, nous avons construit une matrice de transition $M(i,j)$ reliant les 24 états de notre système. En effet, pour chacun des 6 états présentés dans le schéma cinétique général, il existe en fait 4 sous-états tenant compte de l'orientation de la séquence et de la position du moteur (voir l'exemple de levée de dégénérescence de l'état 2 sur la Figure 144). De même que précédemment,

⁷ Au delà de la vitesse de décroissance de l'état initial fixé par les données.

les transitions entre tous les états ne sont pas permises mais seules celles répondant aux ingrédients 1), 2) et 3) (voir section 6.1.2) sont conservées. Ceci nous permet de construire dans un premier temps une matrice $N(i,j)$ regroupant le résultat du glissement pour chaque état. Par exemple, pour l'état 2_1A , on a des transitions possibles vers les états 5_1A ou 4_1A : et on a $p(2_1A \rightarrow 4_1A) = 1 - p(2_1A \rightarrow 5_1A)$. On comprendra aisément que nous ne représenterons pas ici cette matrice.

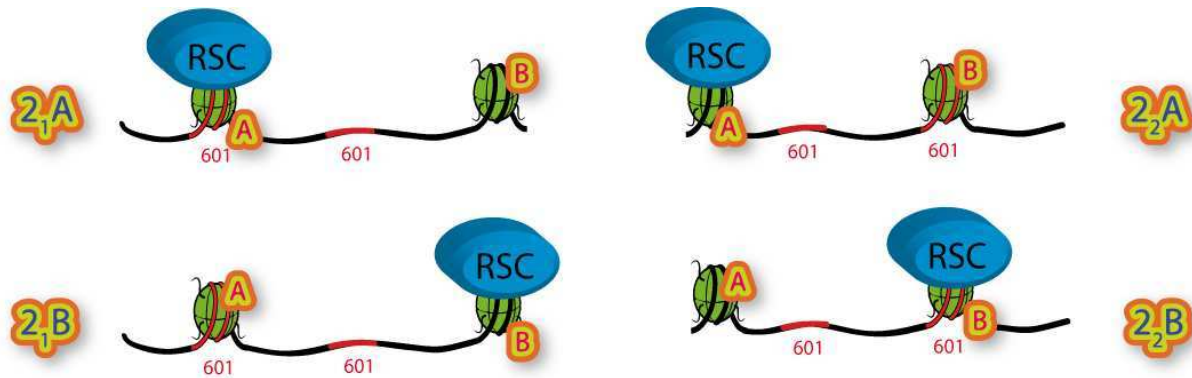


Figure 151 : Levée de dégénérescence de l'état 2

L'état 2, qui a été défini sur le schéma cinétique général de la Figure 144, comporte en fait 4 sous-états du point de vue de sa configuration avec le moteur. Le premier doublement correspond à l'orientation par rapport à la séquence (2_1 et 2_2) et le second doublement correspond au choix du nucléosome par le moteur (2_1A et 2_1B).

Grâce aux simulations précédentes, nous avons compris qu'il existe deux échelles de temps caractéristiques : celle de la réaction cinétiquement limitante (le temps entre chaque itération, fixé à l'aide de la décroissance expérimentale de l'état initial) et celle du mouvement de glissement qui peut être plus longue pour certains nucléosomes (comme $p_{\text{glissement_bout}} < 1$ par exemple). De la manière, nous devons ici prendre en compte ces deux temps caractéristiques :

- pour reproduire l'effet de la réaction cinétiquement limitante qui va désynchroniser les mouvements, on construit une matrice diagonale $A'(i,j)$ dont les termes tous égaux à λ' représentent la probabilité que la tentative de mouvement réussisse (c'est l'exact équivalent de $p = \langle N_{\text{even}} \rangle / N_{\text{tent}}$ dans la section 6.1.3.1.1).
- pour rendre compte d'une hétérogénéité de temps de glissement (efficacité de glissement $p_{\text{glissement}}$ dans la précédente simulation), on construit une matrice diagonale $A(i,j)$ dont les termes λ_i correspondent à un temps de glissement, différent pour chaque état a priori.

Pour conserver la normalisation des probabilités, la matrice de transition finale $M(i,j)$ est donc une combinaison des matrices $N(i,j)$, $A'(i,j)$ et $A(i,j)$ de la forme :

$$M = (A' M_{\text{glissement}} + (1 - A')) \cdot M_{\text{shuffl}}$$

avec :

$$M_{\text{glissement}} = (A N + (1 - A))$$

et la matrice M_{shuffl} représente la probabilité équivalente de choisir le nucléosome n°1 ou le nucléosome n°2 à chaque itération de la simulation ($p_1 = p_2 = 0.5$ dans la précédente simulation). En pratique A et M_{shuffl} prennent donc la forme :

$$\Lambda = \begin{pmatrix} \lambda_1 & & & & & & & \\ & \lambda_2 & & & & & & \\ & & \lambda_3 & & & & & \\ & & & \lambda_4 & & & & \\ & & & & \lambda_5 & & & \\ & & & & & \lambda_6 & & \\ & & & & & & \lambda_7 & \\ & & & & & & & \lambda_8 \\ & & & & & & & \dots \\ & & & & & & & \dots \end{pmatrix}, \quad M_{shuffl} = \begin{pmatrix} 0.5 & 0.5 & & & & & & \\ 0.5 & 0.5 & & & & & & \\ & & 0.5 & 0.5 & & & & \\ & & 0.5 & 0.5 & & & & \\ & & & & 0.5 & 0.5 & & \\ & & & & 0.5 & 0.5 & & \\ & & & & & & 0.5 & 0.5 \\ & & & & & & 0.5 & 0.5 \\ & & & & & & & \dots \\ & & & & & & & \dots \end{pmatrix}$$

Au final, par construction, après K itérations de la matrice de transition $M(i,j)$, on peut écrire $P_K = (p_{1A}, p_{1B}, \dots, p_{5A}, p_{5B})$, la probabilité de trouver un nucléosome dans chacun des états, sous la forme :

$$P_K = M^K P_0$$

où $P_0 = P(t=0)$ est le vecteur des conditions initiales que l'on prendra égal à $(0.25, 0.25, 0.25, 0.25, 0, 0, 0, 0, 0, 0, \dots, 0)$ puisque que les di-nucléosomes initiaux sont tous positionnés dans la séquence 601.

Pour ajuster nos données, nous allons laisser un certain nombre de paramètres libres en fonction des différents modèles testés, et tenter d'ajuster ces paramètres à nos données à l'aide d'un algorithme de minimisation du type Simplex ne faisant pas intervenir de gradient dans l'espace des paramètres. (Lagarias *et coll.* 1998). Le paramètre λ' de la matrice Λ' est, comme précédemment, fixé à l'aide de l'expérience puisqu'il décrit la vitesse de décroissance de l'état initial. On peut remarquer que si les λ' sont tous proches de 1, on a $M_{glissement} = N$.

6.1.3.2.1 Les modèles non séquentiels

Si l'on ne réalise qu'une seule occurrence de la matrice $M_{glissement}$ à chaque étape, on obtient de la même manière que dans la simulation précédente un modèle non séquentiel. Pour ce type de modèles, nous autorisons les mouvements à ne pas être obligatoirement isotropes (donc les $p(i \rightarrow j)$ de la matrice N à être différent de 0.5) mais nous imposons une efficacité de glissement identique pour tous les mouvements (tous les λ_i constants et égaux à 1). C'est donc une généralisation de la simulation numérique de la section 6.1.3.1.2 réalisée pour un modèle non séquentiel et isotrope, qui va nous permettre de tester si un modèle non séquentiel non isotrope peut rendre compte de nos données.

Comme il est difficile de faire converger n'importe quel algorithme avec 24 paramètres libres, on considèrera que $p(i \rightarrow j)$ ne peut prendre que 3 valeurs selon le type de nucléosome à déplacer : 'dans la séquence 601', 'hors du 601' et 'au bout'. Ceci correspondra à trois paramètres libres associés : $p(601 \rightarrow j)$, $p(hors \rightarrow j)$ et $p(bout \rightarrow j)$. Le résultat est que, quelles que soient les valeurs initiales de ces 3 paramètres libres (tirés uniformément entre 0 et 1) l'algorithme de minimisation ne converge pas et on trouve un $\langle \chi^2 \rangle = 0.8$ que l'on pourra comparer au résultat des modèles suivants.

Si l'on suppose maintenant que ce n'est plus la directionnalité qui peut varier mais l'efficacité du glissement, on libère alors les paramètres λ_i et on pose $p(i \rightarrow j) = 0.5$ (glissement isotrope). De la même manière, on considèrera que l'efficacité de glissement ne pourra prendre que 3 valeurs λ_{601} , λ_{hors} et λ_{bout} . A nouveau, il n'est pas possible de faire converger l'algorithme de minimisation ($\langle \chi^2 \rangle = 0.86$).

6.1.3.2.2 Les modèles séquentiels

Si l'on considère un modèle séquentiel avec deux actions du moteur à chaque étape et que le moteur change de nucléosome à l'intérieur du même di-nucléosome entre les deux actions de glissement, $M_{\text{glissement}}$ s'écrit :

$$M_{\text{glissement}} = (\Lambda \cdot N + (1 - \Lambda)) \cdot M_{\text{chang}} \cdot (\Lambda \cdot N + (1 - \Lambda))$$

où M_{chang} est une matrice permettant de passer le moteur d'un nucléosome à l'autre sur le di-nucléosome, de la forme :

$$M_{\text{chang}} = \begin{pmatrix} & & & & & & \\ & 1 & & & & & \\ 1 & & & & & & \\ & & 1 & & & & \\ & & & 1 & & & \\ & & & & 1 & & \\ & & & & & 1 & \\ & & & & & & 1 \\ & & & & & & & \dots \\ & & & & & & & & \dots \end{pmatrix}$$

Commençons par essayer d'ajuster les données en conservant comme paramètre libre l'efficacité de glissement (λ_{601} , λ_{hors} et λ_{bout}) et en supposant un modèle isotrope ($p(i \rightarrow j) = 0.5$).

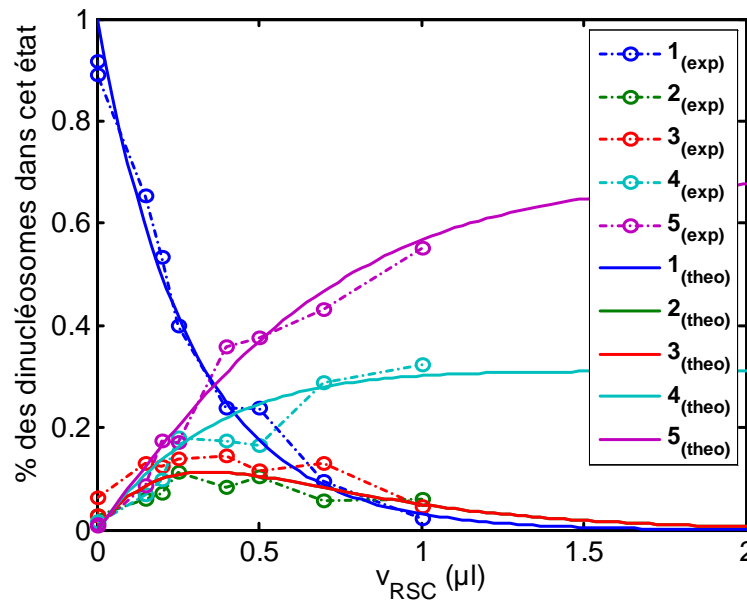


Figure 152 : Comparaison des données expérimentales et des données simulées à l'aide d'une chaîne de Markov

Comparaison des données expérimentales (en symboles et traits pointillés) et simulées à l'aide d'une chaîne de Markov (en traits pleins) pour les états dégroupés (états 1 à 5) au cours de la titration de la réaction de remodelage des di-nucléosomes par RSC. La simulation est basée sur le modèle séquentiel et isotrope avec changement de nucléosome entre chaque action sur le di-nucléosome. L'ajustement converge pour des paramètres $\lambda_{601} = \lambda_{\text{hors}} = 1$, et $\lambda_{\text{bout}} = 0.19$ avec $\langle \chi^2 \rangle = 0.06$. On a donc une efficacité réduite du glissement des nucléosomes situés à l'extrémité du fragment d'ADN.

Avec l'algorithme d'optimisation, on obtient un bon accord avec les données expérimentales (voir Figure 152 pour une valeur des paramètres $\lambda_{601} = \lambda_{hors} = 1$, et $\lambda_{bout} = 0.19$ avec $\langle \chi^2 \rangle = 0.06$. On a donc une efficacité de glissement réduite pour un nucléosome placé à l'extrémité du fragment et les valeurs d'efficacité sont très proches de ce que nous avons obtenu manuellement par la simulation ($p_{glissement\ bout} = 0.2$ et $p_{autre} = 1$).

On peut tester, avec les mêmes paramètres libres d'autres modèles séquentiels et isotropes, comme celui autorisant par exemple $n=3$ mouvements de nucléosomes par itération. Il apparaît que l'ajustement est impossible moins bon pour $n \neq 2$ ($\langle \chi^2 \rangle > 0.2$).

On peut également conserver la séquentialité de 2 mouvements mais autoriser le moteur à rester sur le même nucléosome, dans ce cas l'algorithme ne permet pas de reproduire les données de manière satisfaisante ($\langle \chi^2 \rangle \sim 0.2$).

Enfin, dans le cadre du modèle qui marche, c'est à dire séquentiel avec deux mouvements et changement de nucléosome, nous pouvons tester le cas où l'efficacité de glissement est la même pour tous les nucléosomes ($\lambda_i = 1$) et laisser libres les paramètres de directionnalité ($p(i \rightarrow j)$) libres pour tester le caractère isotrope des transitions. L'algorithme converge également et on obtient $p(601 \rightarrow j) = 0.6$, $p(hors \rightarrow j) = 0$ et $p(bout \rightarrow j) = 0.2$ avec $\langle \chi^2 \rangle \sim 0.06$. Si l'ajustement des données est bon, les valeurs des paramètres de directionnalité obtenues sont difficiles à interpréter physiquement, en particulier $p(hors \rightarrow j) = 0$ supposerait que le moteur serait capable de s'orienter selon l'hélicité de l'ADN pour ces nucléosomes uniquement.

	Modèle isotrope		Modèle iso-productif	
	oui	non	oui	non
k=1	X	X	X	X
k=2	X	OK	X	OK
k>2	X	X	X	X

Tableau 4: Comparaison de l'ajustement des données expérimentales à plusieurs modèles

Résultats de l'ajustement des données expérimentales par différents modèles de glissement des di-nucléosomes par RSC. Nous avons testé des modèles séquentiels ($k \geq 2$) ou non séquentiel ($k=1$), isotrope ou non-isotrope, iso-productif ou non. Seuls les modèles séquentiels à deux étapes avec changement de nucléosome permettent la convergence de l'algorithme.

Nous avons donc montré en utilisant les chaînes de Markov que l'ajustement des modèles non séquentiels n'est pas possible dans le cadre de notre algorithme de minimisation (Tableau 4). En outre, pour les modèles séquentiels, le modèle de deux mouvements avec changement de nucléosome est le seul à vraiment rendre compte de nos données expérimentales et nous permet de mettre en évidence le caractère particulier des nucléosomes placés au bout du substrat. A nouveau nous favoriserons l'interprétation selon laquelle le moteur serait isotrope plutôt que iso-productif.

D'autres algorithmes comme ceux basés sur les méthodes de 'golden section search' et d'interpolation parabolique donnent le même résultat ce qui renforce cette conclusion.

En conclusion de cette partie nous pouvons dire qu'à l'aide de ces deux types de modélisation (simulation numérique et chaînes de Markov) nous avons montré qu'un modèle processif isotrope et séquentiel rend compte des données et que les autres modèles testés bien que plus complexes ne permettent pas quant à eux de rendre compte de l'évolution des états observés.

6.1.3.3 Conclusion sur le glissement des di-nucléosomes

Cette partie nous a permis d'aborder la question du mécanisme de glissement par les facteurs de remodelage à une autre échelle en nous focalisant sur les di-nucléosomes. L'imagerie AFM nous a permis de montrer que l'on voit apparaître cinq types d'états pour les di-nucléosomes lors du remodelage par RSC. L'état stationnaire est composé de deux sortes de di-nucléosomes : un nucléosome placé à chaque extrémité du fragment ou les deux nucléosomes placés à la même extrémité. Nous avons choisi de tester différents modèles simples pour expliquer ces données. Au risque d'alourdir notre propos, nous avons choisi de tester plusieurs modèles pour pouvoir mieux les éliminer ensuite et renforcer notre conclusion.

Au final, nous avons montré que, lors de son action de déplacement des nucléosomes, RSC est processif, isotrope et séquentiel. Nous avons observé que RSC réalise une action séquentielle lorsqu'il déplace les di-nucléosomes : celui-ci interagit avec l'un des nucléosomes puis systématiquement avec l'autre avant de se décrocher. De plus, nous avons mis en évidence que l'action de ce mécano-enzyme est réduite pour des nucléosomes placés au bout du fragment. Nous avons interprété ce dernier résultat soit comme une efficacité de remodelage réduite soit comme une constante d'association plus faible pour ces nucléosomes. Dans les deux cas cette différence provient probablement de l'absence d'ADN de liaison sur l'un des côtés du nucléosome.

Dans certains cas, nous avons observé des di-nucléosomes où les deux NCPs sont en contacts au milieu du fragment ADN (états 2 et 2b). Cela montre que RSC est incapable lorsqu'il déplace un nucléosome d'entraîner le second nucléosome dans son action (force produite insuffisante) ou bien qu'il est nécessaire pour RSC de remodeler au préalable les deux nucléosomes avant de pouvoir les glisser.

Pour cette étude nous avons choisi de ne pas prendre en compte les mono-nucléosomes. Nous avons observé qu'une partie de ces mono-nucléosomes est issue de l'éjection d'un nucléosome par RSC au cours de son action. Leur intégration dans le modèle permettrait de nous intéresser à leur origine (en particulier de quel type de di-nucléosome ils sont issus) et de quantifier l'efficacité d'éjection de RSC.

Enfin, on peut comprendre la séquentialité du moteur soit comme un mécanisme particulier de ce type de moteur qui l'empêcherait de se refixer sur le même substrat (temps de latence) associé à une translocation 1D sur l'ADN soit comme le fait que, du point de vue de la diffusion libre (3D) du moteur, le nucléosome le plus proche du nucléosome considéré est l'autre NCP du di-nucléosome. Pour tester ces deux hypothèses il conviendrait donc de travailler avec des substrats possédant un plus grand nombre de répétitions.

Dans les parties suivantes, nous avons testé le caractère prédictif de notre modèle à l'aide de deux systèmes témoins : les mono-nucléosomes marqués et les tri-nucléosomes.

6.1.4 Retour sur le glissement des mono-nucléosomes marqués

En gardant en mémoire ces résultats sur le glissement des di-nucléosomes, nous allons maintenant revenir sur les données obtenues dans le cas de mono-nucléosomes marqués (section 5.2.1.2, en particulier voir Figure 131). Nous avons observé que lors de l'action de RSC, la direction du glissement était majoritairement imposée par la présence de la streptavidine. Quelque soit la construction nucléosomale (symétrique ou asymétrique) la majorité des nucléosomes (~ 70 %) avait été glissée à l'opposé de la streptavidine (par comptage également manuel). Nous avons alors pensé à un effet 'répulsif' de cette protéine. A la lumière de ce que l'on vient de voir, on peut se demander s'il est possible d'expliquer ce résultat. Pour ce faire, nous supposons que la streptavidine se comporte comme un nucléosome immobile placé au bout du fragment d'ADN et

nous réutiliserons les paramètres dynamiques issus des simulations effectuées pour expliquer le comportement des di-nucléosomes.

Nous avons repris le modèle d'un moteur isotrope ($p_- = p_+ = 0.5$), non iso-productif ($p_{\text{glissement_bout}} = 0.2$ et $p_{\text{glissement_autre}} = 1$) et séquentiel ($p_{\text{séquentiel}} = 1$ et $p_{\text{change_nuc}} = 1$), c'est à dire effectuant deux actions consécutives (une sur chaque nucléosome du di-nucléosome) à chaque pas de temps. Nous avons modifié la simulation expliquée dans la section 6.1.3.1 en considérant qu'un des deux nucléosomes du di-nucléosome est immobile (la streptavidine) et en conservant la dynamique particulière des nucléosomes placés au bout du fragment ADN ($p_{\text{glissement_bout}} = 0.2$).

Nous avons ensuite placé sur le résultat de cette simulation les points expérimentaux obtenus pour les mono-nucléosomes marqués. Nous n'avons pas de cinétique complète qui nous permettrait, comme pour les di-nucléosomes, d'ajuster la décroissance de l'état initial. Pour déterminer à quelle abscisse placer ces points nous avons cherché quelle valeur de la coordonnée de réaction conduit à une proportion équivalente de nucléosomes initiaux. Notons que les points expérimentaux combinent plusieurs expériences réalisées dans des conditions différentes de glissement et pour des constructions différentes (symétriques et asymétriques). On observe sur la Figure 153 qu'ils correspondent précisément aux prédictions de la simulation.

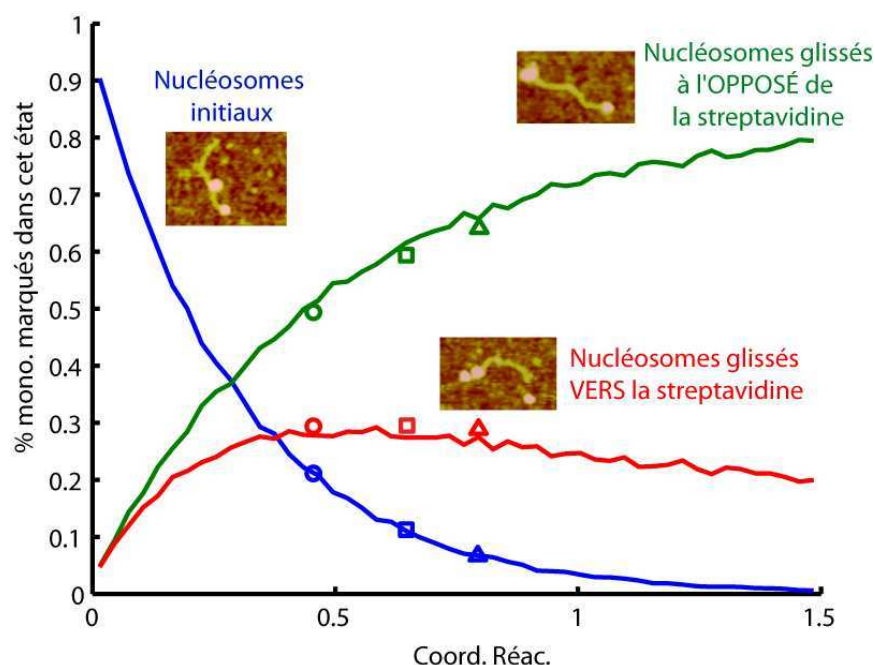


Figure 153 : Simulation du glissement de mono-nucléosomes marqués dans le cadre du modèle de glissement des di-nucléosomes

Si l'on considère les nucléosomes marqués comme des di-nucléosomes dans lesquels la streptavidine serait un nucléosome non mobilisable au bout du fragment, il est possible d'utiliser le modèle et les paramètres dynamiques mesurés pour les di-nucléosomes pour simuler l'évolution des différents états au cours du remodelage par RSC. Nous avons placé les données expérimentales obtenues pour les mono-nucléosomes marqués sur un tel modèle. On remarque le très bon accord quantitatif entre théorie et expérience. Les ronds, carrés et triangles correspondent respectivement à des expériences réalisées avec les constructions 127-601-82s, 127s-601-82, 82s-601-82.

Ceci montre que le résultat obtenu pour les mono-nucléosomes marqués peut complètement être expliqué à l'aide du modèle obtenu pour les di-nucléosomes si l'on considère que la streptavidine se comporte comme un nucléosome immobile placé au bout du fragment ADN. Tout se passe donc comme si RSC était capable de mobiliser de manière équivalente un nucléosome placé dans une séquence positionnante, contre un autre nucléosome ou contre une autre protéine tout à fait différente (et chargée) comme la streptavidine. Enfin, ceci permet de vérifier dans le cas

où l'approche du bord serait empêchée par un autre complexe que le nucléosome, que seuls les nucléosomes placés au bout du fragment présentent des paramètres dynamiques différents.

Pour continuer de tester notre modèle et en particulier le glissement des nucléosomes placés au bout du fragment nous allons étudier dans ce qui suit le remodelage de tri-nucléosomes par RSC.

6.2 RSC et tri-nucléosomes positionnés

Pour vérifier la généralité de notre modèle dans un contexte plus proche encore de la situation physiologique, nous avons utilisé des tri-nucléosomes positionnés. Pour ne pas être influencé par des effets de processivité et faciliter la visualisation des objets, nous avons utilisé une construction nucléosomale pour laquelle la longueur totale d'ADN libre est du même ordre de grandeur que pour les di-nucléosomes (~150 pb) (Figure 154). Les nucléosomes sont ici séparés par un ADN de liaison de 50 pb et les bras d'ADN de part et d'autre du fragment mesurent 25 pb.



Figure 154 : Construction utilisée pour les tri-nucléosomes

Le fragment d'ADN utilisé comporte trois séquences positionnantes 601 séparées par un ADN de liaison de 50 pb et entourées de part et d'autre par des bras ADN de 25 pb. La longueur totale du fragment d'ADN est de 591 pb et la longueur totale d'ADN libre est 150 pb.

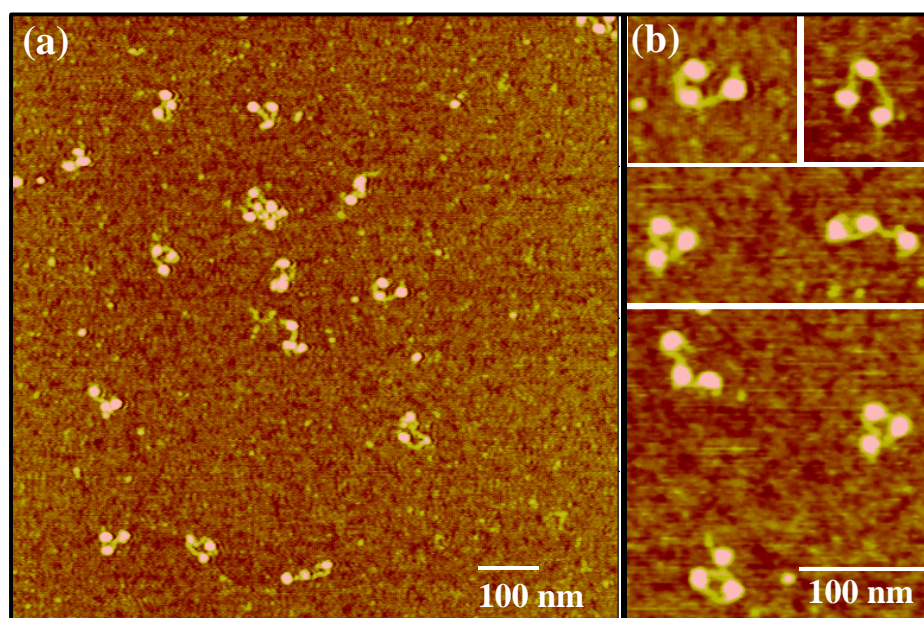


Figure 155 : Images AFM des tri-nucléosomes à l'équilibre

(a) Images AFM de topographie de tri-nucléosomes à l'équilibre. Echelle Z : de 0 nm (marron foncé) à 2.5 nm (blanc). (b) Zooms sur certains oligosomes. On distingue bien les trois nucléosomes et on remarque que les bras de part et d'autre du fragment sont plus courts que l'ADN de liaison (attendu par construction du fragment).

Comme on le voit sur les images AFM obtenues pour ces oligo-nucléosomes (Figure 155) on repère facilement les trois nucléosomes, qui sont nettement séparés. On remarque que les bras ADN de part et d'autre du fragment sont clairement plus court que l'ADN de liaison comme attendu de part la construction du fragment (Figure 155).

En appliquant le même protocole que précédemment nous avons alors fait réagir ces tri-nucléosomes avec RSC (Figure 156). On observe alors un grand nombre de configurations parfois difficiles à analyser. Néanmoins lorsque l'action de RSC est suffisamment avancée, on observe une majorité de tri-nucléosomes dans la configuration où deux nucléosomes sont glissés du même côté alors que le troisième nucléosome est glissée vers l'autre bout du fragment (Figure 156b). On observe aussi des tri-nucléosomes pour lequel les trois nucléosomes sont glissés vers la même extrémité du fragment (Figure 156d). Enfin on observe un nombre réduit de tri-nucléosomes pour lesquels un seul des nucléosomes a été glissé (Figure 156c).

Nous avons quantifié « manuellement » la proportion relative de tri-nucléosomes pour lesquels deux des nucléosomes sont positionnés à une des extrémités et le troisième nucléosome à l'autre extrémité (configuration I) par rapport à la situation où les trois nucléosomes sont glissés du même côté (configuration II) (voir Figure 157). Il apparaît que la première configuration représente ~ 65 % des évènements (sur une centaine d'objets analysés). A noter que nous observons quelques di-nucléosomes, ils sont tous dans l'état 5 (un à chaque extrémité du fragment).

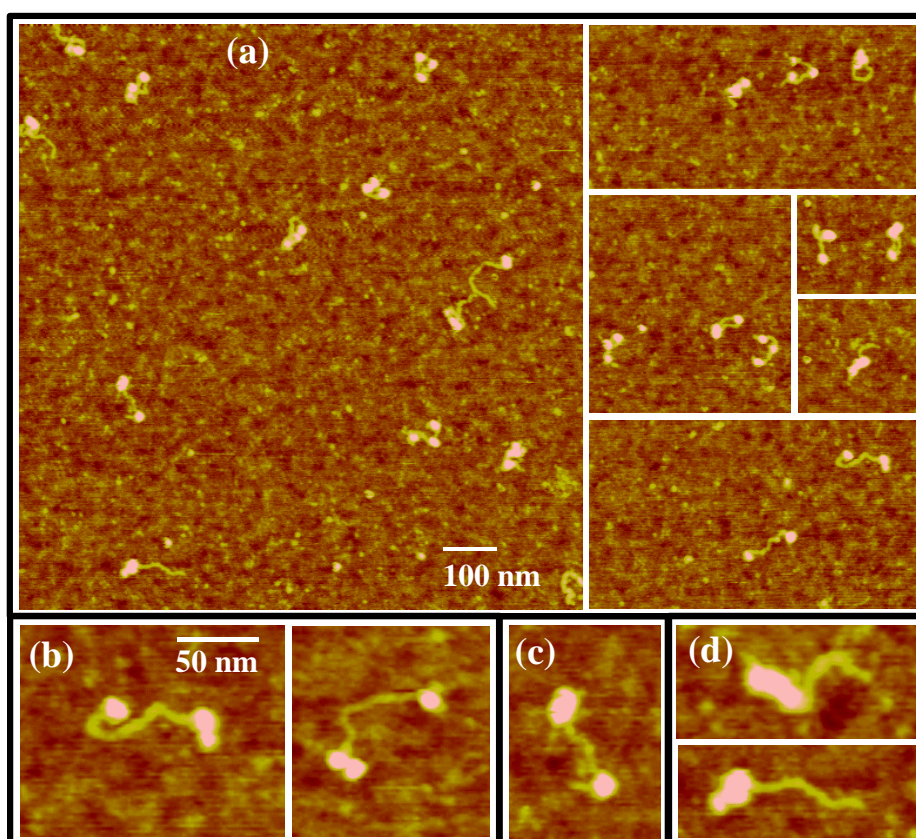


Figure 156 : Images AFM de tri-nucléosomes au cours du remodelage par RSC

(a) Images AFM de topographie de tri-nucléosomes après incubation avec RSC et de l'ATP pendant une heure. Echelle Z : de 0 nm (marron foncé) à 2.5 nm (blanc). On distingue plusieurs types d'états, parmi lesquels les plus observés sont illustrés sur les zooms (b à d)

Pour interpréter ce résultat dans le cas de notre modèle calculons la proportion relative théorique des configurations I et II dans l'état stationnaire

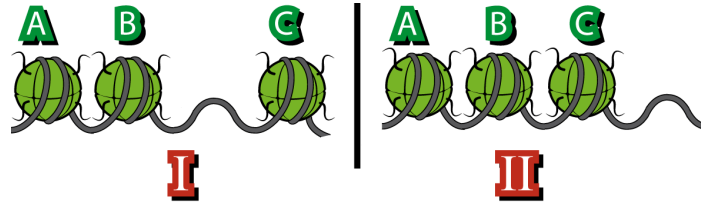


Figure 157 : Les deux configurations majoritaires des tri-nucléosomes glissés par RSC dans l'état stationnaire

Représentation schématique des deux configurations de tri-nucléosomes majoritaires dans l'état stationnaire : dans la configuration I deux des nucléosomes sont positionnés à l'une des extrémités et le troisième nucléosome à l'autre extrémité, et dans la configuration II les trois nucléosomes sont glissés du même côté.

Dans un premier temps nous déterminons les configurations issues du glissement par RSC sur à partir des configurations I et II :

Configuration I :

Nucléosome déplacé	Mouvement $\rightarrow (p_+)$	Mouvement $\leftarrow (p_-)$
A	(I) avec $p = 1$	
B	(I) avec $p = 1$	
C	(I) avec $p = 1 - p_- \cdot p_{\text{glissement_bout}}$	(II) avec $p = p_- \cdot p_{\text{glissement_bout}}$

Configuration II :

Nucléosome déplacé	Mouvement $\rightarrow (p_+)$	Mouvement $\leftarrow (p_-)$
A	(I) avec $p = 1$	
B	(I) avec $p = 1$	
C	(I) avec $p = p_+ \cdot p_{\text{glissement_autre}}$	(II) avec $p = 1 - p_+ \cdot p_{\text{glissement_autre}}$

On a donc :

$$\begin{cases} \frac{dp_I}{dt} = -p_- p_{\text{glissement_bout}} \cdot p_I + p_+ p_{\text{glissement_autre}} \cdot p_{II} \\ \frac{dp_{II}}{dt} = p_- p_{\text{glissement_bout}} \cdot p_I - p_+ p_{\text{glissement_autre}} \cdot p_{II} \end{cases}$$

où p_I et p_{II} sont les probabilités d'être respectivement dans la configuration I et II. Dans l'état stationnaire $dp_I/dt = dp_{II}/dt = 0$ et

$$p_I = \frac{p_+ p_{\text{glissement_autre}}}{p_- p_{\text{glissement_bout}}} \cdot p_{II} = \frac{p_{\text{glissement_autre}}}{p_{\text{glissement_bout}}} \cdot p_{II} \approx \frac{1}{0.2} p_{II} \sim 5 p_{II}$$

car $p_+ = p_- = 0.5$ et $p_{\text{glissement_autre}} = 1$ et $p_{\text{glissement_bout}} \sim 0.2$.

Dans le cadre de ce modèle on s'attend à donc à observer $\sim 83\%$ des tri-nucléosomes dans la configuration (I) et $\sim 17\%$ dans la configuration (II).

Notre valeur expérimentale est donc en bon accord avec ces prédictions issues du modèle proposé pour les di-nucléosomes. Cela confirme une fois de plus le caractère isotrope du glissement par RSC et le souligne l'efficacité réduite du remodelage des nucléosomes placés au bout fragment. Qu'en est-il pour des chromatines comportant un plus grand nombre de nucléosomes ? Pour l'observer nous avons prolongé cette étude à des chromatines de 9 nucléosomes. Néanmoins, du fait de la forte compacité des fibres conventionnelles il devient alors difficile de visualiser l'ADN de

liaison et nous avons donc choisi d'utiliser une approche différente utilisant le calcul des facteurs de structures présenté en partie 4.3.

6.3 RSC et oligosomes de 9 répétitions

L'extension du modèle précédent, au cas de chromatine possédant un grand nombre de nucléosome, suggérerait que pour des temps de remodelage importants, le moteur est capable d'accumuler de part et d'autre du fragment tous les nucléosomes de la construction.

Pour essayer de vérifier ce comportement, nous avons utilisé des chromatines positionnées de 9 répétitions que nous avons fait réagir avec RSC pour différentes concentrations du moteur et différents temps. Pour ce faire, nous avons appliqué les méthodes développées pour l'analyse des chromatines à l'équilibre.

Comme on le voit sur les images de la Figure 158 il apparaît lors de la réaction avec RSC des chromatines présentant des longs 'segments' d'ADN libre (Figure 158b, c et d), des chromatines globalement moins compactes (Figure 158e) et des agrégats mal définis (Figure 158f).

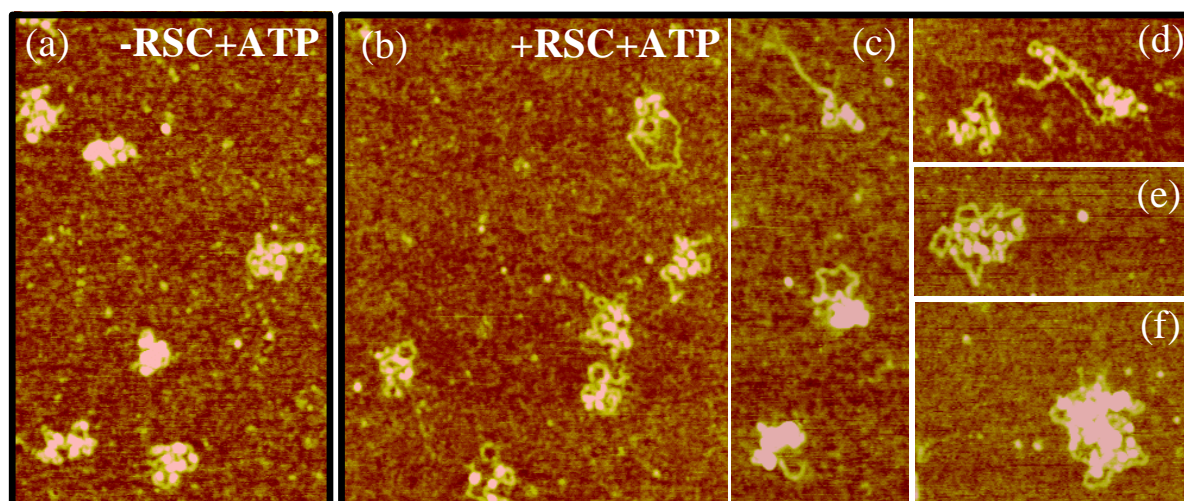


Figure 158 : Images AFM de fibres de chromatine de 9 répétitions au cours du remodelage par RSC

Images AFM de topographie de fibres de chromatine de 9 répétitions de séquences 601 au cours du remodelage par RSC, (a) en l'absence d'ATP et (b à f) en présence d'ATP. Sur le contrôle sans ATP on observe des fibres identiques aux fibres conventionnelles observées lors de l'étude à l'équilibre. Au cours de la réaction avec RSC, il apparaît des chromatines présentant des longs 'segments' d'ADN libre (b, c et d), des chromatines globalement moins compactes (e) et des agrégats mal définis (f).

Pour analyser ces images, nous avons appliqué, comme précédemment, l'analyse d'image permettant d'extraire pour chaque chromatine la position des centroïdes des NCPs et nous avons sélectionné les chromatines dont la saturation est proche de 9 nucléosomes par fibre.

Nous avons ensuite calculé pour plusieurs conditions de glissement, les facteurs de structure expérimentaux (voir section 4.3.1) et nous les avons comparés à la condition $-RSC + ATP$. Comme on le voit sur la Figure 159, les facteurs de structure mesurés dans les conditions $(-RSC + ATP)$ et $(+RSC - ATP)$ sont similaires et présentent un extremum local (ou bosse) caractéristique d'une structure compacte comme nous l'avons observé en l'absence de moteur (voir Figure 104). Pour des conditions de remodelage intermédiaire on observe une disparition du maximum local observé

dans la condition sans glissement. Puis pour des conditions remodelage plus fortes on observe une élévation du plateau intermédiaire.

A la lumière de ce que nous avons vu pour les fibres de nucléosomes variants et conventionnels à l'équilibre tout se passe comme si le facteur de remodelage était capable (à la manière d'un nucléosome variant H2A.Bbd) d'empêcher la formation d'une structure compacte d'ordre supérieur caractéristique des fibres conventionnelles. Ceci peut être dû soit à la perte du phasage 1D des nucléosomes au moment du glissement soit à la rupture des contacts inter-nucléosomes du fait du remodelage des nucléosomes. En outre, on peut supposer que la modification de la position du plateau en fonction de l'avancée de la réaction correspond au résultat de l'accumulation des nucléosomes de part et d'autre du fragment ADN (accumulation corroborée par l'apparition de longs segments d'ADN nu sur les images AFM).

En effet, la position du plateau étant liée au rayon de giration de la pelote son élévation supposerait que la fibre de nucléosomes se rigidifie. Pour tester cette dernière hypothèse il serait donc utile, à la manière de ce que nous avons fait à l'équilibre (voir 4.3.2), de construire par simulation numérique 2D différents types de pelotes désorganisées soit du point de vue de la longueur de l'ADN de liaison soit du point de vue de la flexibilité des nucléosomes. Nous pourrions alors trancher entre ces différentes hypothèses.

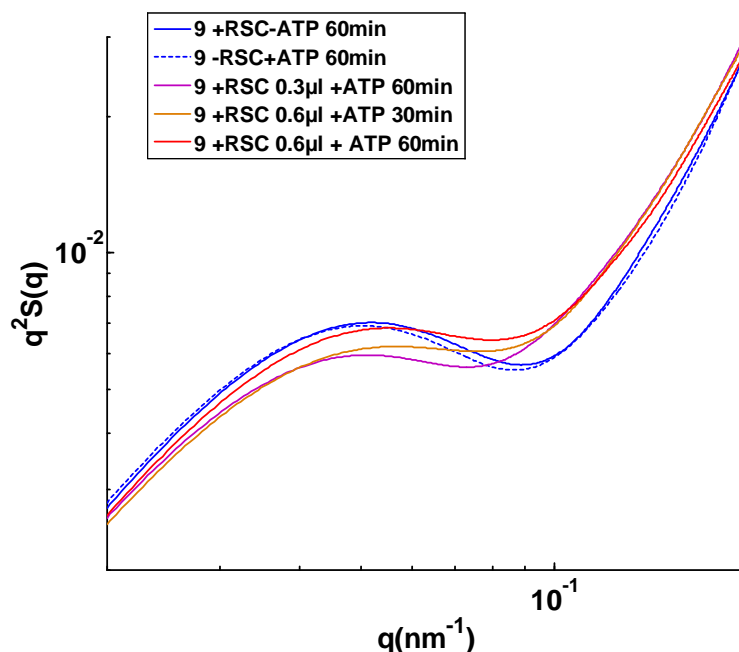


Figure 159 : Kratky-plots des fibres de chromatines au cours du remodelage par RSC

Kratky-plots pour les facteurs de structure expérimentaux calculés pour des fibres de 9 répétitions avant ou au cours du remodelage par RSC. En bleu, les conditions correspondant à l'absence de remodelage (- ATP + RSC ou - RSC + ATP). En mauve et orange, les conditions intermédiaires respectivement de temps ($v_{RSC} = 0.6\mu\text{L}$ et $t = 30$ min) ou de concentrations en RSC ($v_{RSC} = 0.3\mu\text{L}$ et $t = 60$ min). En rouge, la condition de remodelage la plus avancée ($v_{RSC} = 0.6\mu\text{L}$ et $t = 60$ min). On remarque que l'action de RSC entraîne la disparition du maximum local caractéristique des fibres conventionnelles et que la position du plateau se décale pour la condition la plus remodelée.

En complément de ces mesures structurales, il serait intéressant d'avoir accès à la position des nucléosomes à une dimension (le long de l'ADN). Pour cela, cela il faudrait pouvoir 'déplier' la fibre de chromatine sur la surface, ce qui nécessiterait un développement à partir des techniques existantes de dépôt.

Conclusions et Perspectives

Souvent présentée comme une hiérarchie continue de degrés de compaction de l'ADN, la chromatine est, avant tout, une structure mobile et dynamique. En effet, dans le contexte d'un environnement aussi compact que le noyau cellulaire où 40 % du volume est occupé par des protéines et de l'ADN il paraît clair que la structure de la chromatine a été sélectionnée pour permettre un accès rapide et sélectif à l'ADN. La compréhension des facteurs contraignants ou facilitant les fluctuations d'un tel système nous permet de mieux appréhender la manière selon laquelle il est possible d'accéder à l'information génétique. Les résultats exposés dans cette thèse soulignent le caractère fondamental de la dynamique du nucléosome dans la fonction chromatinienne. Nous avons étudié les facteurs de remodelage et les variants d'histones qui sont deux types de phénomènes capables de modifier l'organisation et la stabilité du nucléosome, et plus largement de la chromatine

En nous intéressant tout d'abord à des fragments de chromatine à l'équilibre nous avons montré que l'incorporation d'un variant d'histone, tel que H2A.Bbd, modifie profondément la physique des mono- et oligo-nucléosomes. Ces observations nous ont conduit à proposer un modèle mettant en avant le rôle des fluctuations d'ouverture et de fermeture de tels nucléosomes dans la formation du degré d'organisation supérieure de la chromatine qu'est la fibre compacte de 30nm. On peut supposer que d'autres variants d'histones ou d'autres processus comme la liaison d'un facteur de transcription sur l'ADN nucléosomal ou la modification chimique des queues d'histones seraient eux aussi susceptibles de donner lieu à des effets semblables. Il serait alors intéressant de montrer à quel point une perturbation locale de la fibre de chromatine au niveau d'un nucléosome conduirait là aussi à un dépliement de la fibre de 30 nm. En ce qui concerne les variants d'histones, les fibres de nucléosomes H2A.Z qui sont connues pour former plus facilement une fibre compacte sembleraient de bonnes candidates pour étendre notre étude à un variant d'histone qui serait dans ce cas susceptible de réduire la dynamique nucléosomale.

Au-delà de cette étude à l'équilibre nous avons montré que les facteurs de remodelage de la sous-famille de swi2/snf2 sont eux aussi capables de modifier la dynamique du nucléosome en créant un intermédiaire réactionnel nucléosomal sur-complexé et très labile apparaissant en amont de l'état glissé communément observé. Les propriétés de cette particule nucléosomale remodelée semblent indiquer qu'elle correspond à un compromis structurel entre le nucléosome standard et l'éjection ou le déplacement du nucléosome. On peut donc supposer que la formation de tels substrats a un impact important dans bon nombre de processus cellulaires qui nécessitent un accès à l'ADN chromatinien. Il serait intéressant de tester son impact sur la faculté à transcrire, réparer ou répliquer l'ADN nucléosomal. Pour approfondir le mécanisme du remodelage il paraît important de déterminer quels paramètres conduisent à ce que la première action du moteur entraîne la formation d'un tel objet alors que la deuxième conduit au glissement. En particulier on peut se demander si la dynamique et la structure particulière de cette particule remodelée sont le signal de reconnaissance entraînant le glissement pour le facteur de remodelage. Pour étudier la généralité de cet état métastable dans le remodelage il serait, en outre, important de tester son apparition dans le cadre de remodeleur d'une autre famille comme isw2 ou isw1a/b. Ces enzymes étant connus pour ne pas accentuer l'accessibilité à l'ADN lors du glissement, l'absence d'état métastable mettrait en évidence des différences fonctionnelles entre ces deux familles de moteur.

Enfin, nous nous sommes intéressés à l'étude du glissement par RSC à une échelle plus grande. Nous avons montré que ce facteur de remodelage se comporte pour des di-nucléosomes comme un moteur moléculaire stochastique d'une grande processivité (>200 pb) capable de glisser les nucléosomes de manière séquentielle. Nous avons également observé que ce mécano-enzyme ne

présente aucune directionnalité particulière et ne subit pas d'effet de séquence. Pour aller plus loin dans la quantification, il serait intéressant de développer des méthodes de dépôt de chromatines remodelées permettant d'aligner les chapelets nucléosomiaux puis de mesurer de la même manière que pour les mono-nucléosomes la formation de l'état remodelé et le glissement des nucléosomes présents dans une fibre. En particulier, on peut se demander ce qui se passerait si l'on était capable d'insérer un nucléosome non mobilisable, comme le nucléosome H2A.Bbd, au sein d'une fibre de nucléosomes conventionnels. RSC serait-il alors capable de déplacer les nucléosomes de part et d'autre de celui-ci ? Enfin, l'étude de longues chromatines permettrait de s'intéresser à la manière dont le moteur passe d'un nucléosome au suivant et permettrait peut-être de mettre en avant les limites de la séquentialité de ce moteur comme il existe des limites à sa processivité sur l'ADN.

Finalement, des expériences réalisées sur des chromatines conventionnelles nous ont permis de montrer la capacité de RSC à relâcher la structure compacte d'une fibre conventionnelle à la manière de ce que nous avons observé pour les fibres variantes H2A.Bbd. Ceci montre donc, que dans le cas des facteurs de remodelage ou celui des variants d'histones, nous observons qu'une modification de la dynamique du nucléosome modifie profondément la structure à plus grande échelle de la fibre de chromatine. Il serait donc très intéressant d'imaginer des expériences permettant d'extraire et de purifier des portions de chromatines remodelées ou variantes pour vérifier ces observations au plus près de la situation cellulaire.

Bibliographie

- Aasland, R., A. F. Stewart et T. Gibson (1996). "The SANT domain: a putative DNA-binding domain in the SWI-SNF and ADA complexes, the transcriptional co-repressor N-CoR and TFIIB." *Trends Biochem Sci* **21**(3): 87-8.
- Abbondanzieri, E. A., W. J. Greenleaf, J. W. Shaevitz, R. Landick et S. M. Block (2005). "Direct observation of base-pair stepping by RNA polymerase." *Nature* **438**(7067): 460-5.
- Abbott, D. W., V. S. Ivanova, X. Wang, W. M. Bonner et J. Ausio (2001). "Characterization of the stability and folding of H2A.Z chromatin particles: implications for transcriptional activation." *J Biol Chem* **276**(45): 41945-9.
- Abrahams, J. P., A. G. W. Leslie, R. Lutter et J. E. Walker (1994). "Structure at 2.8 Å resolution of F₁-ATPase from bovine heart mitochondria." *Nature* **370**(6491): 621-628.
- Adachi, K., K. Oiwa, T. Nishizaka, S. Furuike, H. Noji, H. Itoh, M. Yoshida et K. Kinoshita, Jr. (2007). "Coupling of rotation and catalysis in F₁-ATPase revealed by single-molecule imaging and manipulation." *Cell* **130**(2): 309-21.
- Ahmad, K. et S. Henikoff (2002). "The histone variant H3.3 marks active chromatin by replication-independent nucleosome assembly." *Mol Cell* **9**(6): 1191-200.
- Alberts, B. (1983). *Molecular biology of the cell*, New York: Garland Pub.
- Altman, D., H. L. Sweeney et J. A. Spudis (2004). "The mechanism of myosin VI translocation and its load-induced anchoring." *Cell* **116**(5): 737-49.
- Amor, D. J., P. Kalitsis, H. Sumer et K. H. Choo (2004). "Building the centromere: from foundation proteins to 3D organization." *Trends Cell Biol* **14**(7): 359-68.
- Anderson, J. D. et J. Widom (2000). "Sequence and position-dependence of the equilibrium accessibility of nucleosomal DNA target sites." *J Mol Biol* **296**(4): 979-87.
- Angelov, D., M. Charra, C. W. Muller, J. Cadet et S. Dimitrov (2003). "Solution study of the NF-kappaB p50-DNA complex by UV laser protein-DNA cross-linking." *Photochem Photobiol* **77**(6): 592-6.
- Angelov, D., A. Verdel, W. An, V. Bondarenko, F. Hans, C. M. Doyen, V. M. Studitsky, A. Hamiche, R. G. Roeder, P. Bouvet et S. Dimitrov (2004). "SWI/SNF remodeling and p300-dependent transcription of histone variant H2ABbd nucleosomal arrays." *Embo J* **23**(19): 3815-24.
- Angus-Hill, M. L., A. Schlichter, D. Roberts, H. Erdjument-Bromage, P. Tempst et B. R. Cairns (2001). "A Rsc3/Rsc30 zinc cluster dimer reveals novel roles for the chromatin remodeler RSC in gene expression and cell cycle control." *Mol Cell* **7**(4): 741-51.
- Aoyagi, S. et J. J. Hayes (2002). "hSWI/SNF-catalyzed nucleosome sliding does not occur solely via a twist-diffusion mechanism." *Mol Cell Biol* **22**(21): 7484-90.
- Aoyagi, S., G. Narlikar, C. Zheng, S. Sif, R. E. Kingston et J. J. Hayes (2002). "Nucleosome remodeling by the human SWI/SNF complex requires transient global disruption of histone-DNA interactions." *Mol Cell Biol* **22**(11): 3653-62.
- Aoyagi, S., P. A. Wade et J. J. Hayes (2003). "Nucleosome sliding induced by the xMi-2 complex does not occur exclusively via a simple twist-diffusion mechanism." *J Biol Chem* **278**(33): 30562-8.
- Aravind, L. et D. Landsman (1998). "AT-hook motifs identified in a wide variety of DNA-binding proteins." *Nucleic Acids Res* **26**(19): 4413-21.
- Arents, G., R. W. Burlingame, B. C. Wang, W. E. Love et E. N. Moudrianakis (1991). "The nucleosomal core histone octamer at 3.1 Å resolution: a tripartite protein assembly and a left-handed superhelix." *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**(22): 10148-52.
- Asbury, C. L. (2005). "Kinesin: world's tiniest biped." *Curr Opin Cell Biol* **17**(1): 89-97.
- Bachtold, A., M. S. Fuhrer, S. Plyasunov, M. Forero, E. H. Anderson, A. Zettl et P. L. McEuen (2000). "Scanned Probe Microscopy of Electronic Transport in Carbon Nanotubes." *Physical Review Letters* **84**(26): 6082-6085.
- Bao, Y., K. Konesky, Y. J. Park, S. Rosu, P. N. Dyer, D. Rangasamy, D. J. Tremethick, P. J. Laybourn et K. Luger (2004). "Nucleosomes containing the histone variant H2A.Bbd organize only 118 base pairs of DNA." *Embo J* **23**(16): 3314-24.
- Barany, M. (1967). "ATPase Activity of Myosin Correlated with Speed of Muscle Shortening." *The Journal of General Physiology* **50**(6): 197-218.
- Barski, A., S. Cuddapah, K. Cui, T. Y. Roh, D. E. Schones, Z. Wang, G. Wei, I. Chepelev et K. Zhao (2007). "High-resolution profiling of histone methylations in the human genome." *Cell* **129**(4): 823-37.

- Bash, R., H. Wang, C. Anderson, J. Yodh, G. Hager, S. M. Lindsay et D. Lohr (2006). "AFM imaging of protein movements: histone H2A-H2B release during nucleosome remodeling." *FEBS Lett* **580**(19): 4757-61.
- Beard, P. (1978). "Mobility of histones on the chromosome of simian virus 40." *Cell* **15**(3): 955-67.
- Becker, P. B. et W. Horz (2002). "ATP-DEPENDENT NUCLEOSOME REMODELING." *Annual Reviews in Biochemistry* **71**(1): 247-273.
- Bednar, J., R. A. Horowitz, S. A. Grigoryev, L. M. Carruthers, J. C. Hansen, A. J. Koster et C. L. Woodcock (1998). "Nucleosomes, linker DNA, and linker histone form a unique structural motif that directs the higher-order folding and compaction of chromatin." *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**(24): 14173-8.
- Belmont, A. S. (2006). "Mitotic chromosome structure and condensation." *Current Opinion in Cell Biology* **18**(6): 632-638.
- Belmont, A. S. et K. Bruce (1994). "Visualization of G1 chromosomes: a folded, twisted, supercoiled chromonema model of interphase chromatid structure." *J Cell Biol* **127**(2): 287-302.
- Bigot, S., O. A. Saleh, F. Cornet, J. F. Allemand et F. X. Barre (2006). "Oriented loading of FtsK on KOPS." *Nat Struct Mol Biol* **13**(11): 1026-8.
- Binnig, G., C. F. Quate et C. Gerber (1986). "Atomic Force Microscope." *Physical Review Letters* **56**(9): 930-933.
- Binnig, G. et H. Rohrer (1987). "Scanning tunneling microscopy—from birth to adolescence." *Reviews of Modern Physics* **59**(3): 615-625.
- Binnig, G., H. Rohrer, C. Gerber et E. Weibel (1982). "Surface Studies by Scanning Tunneling Microscopy." *Physical Review Letters* **49**(1): 57-61.
- Bishop, T. C. (2004). "Molecular Dynamics Simulations of a Nucleosome and Free DNA." *Arxiv preprint q-bio.BM/0410016*.
- Block, S. M., L. S. Goldstein et B. J. Schnapp (1990). "Bead movement by single kinesin molecules studied with optical tweezers." *Nature* **348**(6299): 348-52.
- Blower, M. D. et G. H. Karpen (2001). "The role of Drosophila CID in kinetochore formation, cell-cycle progression and heterochromatin interactions." *Nat Cell Biol* **3**(8): 730-9.
- Boisgard, R., D. Michel et J. P. Aime (1998). "Hysteresis generated by attractive interaction: oscillating behavior of a vibrating tip-microlever system near a surface." *Surface Science* **401**(2): 199-205.
- Bolzer, A., G. Kreth, I. Solovei, D. Koehler, K. Saracoglu, C. Fauth, S. Muller, R. Eils, C. Cremer, M. R. Speicher et T. Cremer (2005). "Three-dimensional maps of all chromosomes in human male fibroblast nuclei and prometaphase rosettes." *PLoS Biol* **3**(5): e157.
- Bonenfant, D., M. Coulot, H. Towbin, P. Schindler et J. van Oostrum (2006). "Characterization of histone H2A and H2B variants and their post-translational modifications by mass spectrometry." *Mol Cell Proteomics* **5**(3): 541-52.
- Bouchiat, C., M. D. Wang, J. F. Allemand, T. Strick, S. M. Block et V. Croquette (1999). "Estimating the Persistence Length of a Worm-Like Chain Molecule from Force-Extension Measurements." *Biophysical Journal* **76**(1): 409-413.
- Boué, F., F. Cousin, J. Gummel, J. Oberdisse, G. Carrot et A. El Harrak (2007). "Small angle scattering from soft matter—application to complex mixed systems." *Comptes Rendus Physique* **8**(7-8): 821-844.
- Boulard, M. (2007). Variants d'histones H2BFWT et macroH2A1: de la structure à la fonction épigénétique, Université Joseph Fourier.
- Boyer, L. A., R. R. Latek et C. L. Peterson (2004). "The SANT domain: a unique histone-tail-binding module?" *Nat Rev Mol Cell Biol* **5**(2): 158-63.
- Boyer, L. A., C. Logie, E. Bonte, P. B. Becker, P. A. Wade, A. P. Wolffe, C. Wu, A. N. Imbalzano et C. L. Peterson (2000). "Functional delineation of three groups of the ATP-dependent family of chromatin remodeling enzymes." *J Biol Chem* **275**(25): 18864-70.
- Bussiek, M., N. Mücke et J. Langowski (2003). "Polylysine-coated mica can be used to observe systematic changes in the supercoiled DNA conformation by scanning force microscopy in solution." *Nucleic Acids Research* **31**(22): e137.
- Bustamante, C., Y. R. Chemla, N. R. Forde et D. Izhaky (2004). "Mechanical processes in biochemistry." *Annu Rev Biochem* **73**: 705-48.
- Bustamante, C. et C. Rivetti (1996). "Visualizing Protein-Nucleic Acid Interactions on a Large Scale with the Scanning Force Microscope." *Annual Reviews in Biophysics and Biomolecular Structure* **25**(1): 395-429.
- Cairns, B. R., H. Erdjument-Bromage, P. Tempst, F. Winston et R. D. Kornberg (1998). "Two actin-related proteins are shared functional components of the chromatin-remodeling complexes RSC and SWI/SNF." *Mol Cell* **2**(5): 639-51.
- Cairns, B. R., N. L. Henry et R. D. Kornberg (1996). "TFG/TAF30/ANC1, a component of the yeast SWI/SNF complex that is similar to the leukemogenic proteins ENL and AF-9." *Mol Cell Biol* **16**(7): 3308-16.
- Cairns, B. R., R. S. Levinson, K. R. Yamamoto et R. D. Kornberg (1996). "Essential role of Swp73p in the function of yeast Swi/Snf complex." *Genes Dev* **10**(17): 2131-44.

- Cairns, B. R., Y. Lorch, Y. Li, M. Zhang, L. Lacomis, H. Erdjument-Bromage, P. Tempst, J. Du, B. Laurent et R. D. Kornberg (1996). "RSC, an essential, abundant chromatin-remodeling complex." *Cell* **87**(7): 1249-60.
- Cairns, B. R., A. Schlichter, H. Erdjument-Bromage, P. Tempst, R. D. Kornberg et F. Winston (1999). "Two functionally distinct forms of the RSC nucleosome-remodeling complex, containing essential AT hook, BAH, and bromodomains." *Mol Cell* **4**(5): 715-23.
- Calladine, C. R. (2004). *Understanding DNA: The Molecule and How it Works*, Academic Press.
- Callebaut, I., J. C. Courvalin et J. P. Mornon (1999). "The BAH (bromo-adjacent homology) domain: a link between DNA methylation, replication and transcriptional regulation." *FEBS Lett* **446**(1): 189-93.
- Camerini-Otero, R. D., B. Sollner-Webb, R. H. Simon, P. Williamson, M. Zasloff et G. Felsenfeld (1978). "Nucleosome structure, DNA folding, and gene activity." *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **42**(Pt 1): 57-75.
- Cao, Y., B. R. Cairns, R. D. Kornberg et B. C. Laurent (1997). "Sfh1p, a component of a novel chromatin-remodeling complex, is required for cell cycle progression." *Mol Cell Biol* **17**(6): 3323-34.
- Carlson, R. D. et D. E. Olins (1976). "Chromatin model calculations: Arrays of spherical nu bodies." *Nucleic Acids Res* **3**(1): 89-100.
- Caterino, T. L. et J. J. Hayes (2007). "Chromatin structure depends on what's in the nucleosome's pocket." *Nat Struct Mol Biol* **14**(11): 1056-8.
- Celeste, A., O. Fernandez-Capetillo, M. J. Kruhlak, D. R. Pilch, D. W. Staudt, A. Lee, R. F. Bonner, W. M. Bonner et A. Nussenzweig (2003). "Histone H2AX phosphorylation is dispensable for the initial recognition of DNA breaks." *Nat Cell Biol* **5**(7): 675-9.
- Chadwick, B. P., C. M. Valley et H. F. Willard (2001). "Histone variant macroH2A contains two distinct macrochromatin domains capable of directing macroH2A to the inactive X chromosome." *Nucleic Acids Res* **29**(13): 2699-705.
- Chadwick, B. P. et H. F. Willard (2001). "Histone H2A variants and the inactive X chromosome: identification of a second macroH2A variant." *Hum Mol Genet* **10**(10): 1101-13.
- Chadwick, B. P. et H. F. Willard (2001). "A novel chromatin protein, distantly related to histone H2A, is largely excluded from the inactive X chromosome." *J Cell Biol* **152**(2): 375-84.
- Chai, B., J. M. Hsu, J. Du et B. C. Laurent (2002). "Yeast RSC function is required for organization of the cellular cytoskeleton via an alternative PKC1 pathway." *Genetics* **161**(2): 575-84.
- Chakravarthy, S., S. K. Gundimella, C. Caron, P. Y. Perche, J. R. Pehrson, S. Khochbin et K. Luger (2005). "Structural characterization of the histone variant macroH2A." *Mol Cell Biol* **25**(17): 7616-24.
- Challoner, P. B., S. B. Moss et M. Groudine (1989). "Expression of replication-dependent histone genes in avian spermatids involves an alternate pathway of mRNA 3'-end formation." *Mol Cell Biol* **9**(3): 902-13.
- Champoux, J. J. (2001). "DNA TOPOISOMERASES: Structure, Function, and Mechanism." *Annual Reviews in Biochemistry* **70**(1): 369-413.
- Chandross, M., E. B. Webb, 3rd, M. J. Stevens, G. S. Grest et S. H. Garofalini (2004). "Systematic study of the effect of disorder on nanotribology of self-assembled monolayers." *Phys Rev Lett* **93**(16): 166103.
- Charvin, G., D. Bensimon et V. Croquette (2003). "Single-molecule study of DNA unlinking by eukaryotic and prokaryotic type-II topoisomerases." *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(17): 9820-5.
- Charvin, G., T. R. Strick, D. Bensimon et V. Croquette (2005). "Topoisomerase IV bends and overtwists DNA upon binding." *Biophys J* **89**(1): 384-92.
- Cheng, H., K. Zhang, J. A. Libera, M. Olvera de la Cruz et M. J. Bedzyk (2006). "Polynucleotide Adsorption to Negatively Charged Surfaces in Divalent Salt Solutions." *Biophysical Journal* **90**(4): 1164-1174.
- Chow, C. M., A. Georgiou, H. Szutorisz, A. Maia e Silva, A. Pombo, I. Barahona, E. Dargelos, C. Canzonetta et N. Dillon (2005). "Variant histone H3.3 marks promoters of transcriptionally active genes during mammalian cell division." *EMBO Rep* **6**(4): 354-60.
- Claudet, C., D. Angelov, P. Bouvet, S. Dimitrov et J. Bednar (2005). "Histone octamer instability under single molecule experiment conditions." *J Biol Chem* **280**(20): 19958-65.
- Cook, P. R. (1995). "A chromomeric model for nuclear and chromosome structure." *J Cell Sci* **108** (Pt 9): 2927-35.
- Cook, P. R. et I. A. Brazell (1975). "Supercoils in human DNA." *J Cell Sci* **19**(2): 261-79.
- Cornea, N. D., D. Silver et P. Min (2007). "Curve-Skeleton Properties, Applications, and Algorithms." *IEEE TRANSACTIONS ON VISUALIZATION AND COMPUTER GRAPHICS*: 530-548.
- Costanzi, C. et J. R. Pehrson (1998). "Histone macroH2A1 is concentrated in the inactive X chromosome of female mammals." *Nature* **393**(6685): 599-601.
- Costanzi, C. et J. R. Pehrson (2001). "MACROH2A2, a new member of the MARCOH2A core histone family." *J Biol Chem* **276**(24): 21776-84.

- Cote, J., C. L. Peterson et J. L. Workman (1998). "Perturbation of nucleosome core structure by the SWI/SNF complex persists after its detachment, enhancing subsequent transcription factor binding." *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**(9): 4947-52.
- Cote, J., J. Quinn, J. L. Workman et C. L. Peterson (1994). "Stimulation of GAL4 derivative binding to nucleosomal DNA by the yeast SWI/SNF complex." *Science* **265**(5168): 53-60.
- Cremer, T. et C. Cremer (2001). "Chromosome territories, nuclear architecture and gene regulation in mammalian cells." *Nat Rev Genet* **2**(4): 292-301.
- Cremer, T. et C. Cremer (2006). "Rise, fall and resurrection of chromosome territories: a historical perspective. Part II. Fall and resurrection of chromosome territories during the 1950s to 1980s. Part III. Chromosome territories and the functional nuclear architecture: experiments and models from the 1990s to the present." *Eur J Histochem* **50**(4): 223-72.
- Cremer, T., M. Cremer, S. Dietzel, S. Muller, I. Solovei et S. Fakan (2006). "Chromosome territories--a functional nuclear landscape." *Curr Opin Cell Biol* **18**(3): 307-16.
- Cremer, T., G. Kreth, H. Koester, R. H. Fink, R. Heintzmann, M. Cremer, I. Solovei, D. Zink et C. Cremer (2000). "Chromosome territories, interchromatin domain compartment, and nuclear matrix: an integrated view of the functional nuclear architecture." *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* **10**(2): 179-212.
- d'Erme, M., G. Yang, E. Sheagly, F. Palitti et C. Bustamante (2001). "Effect of poly(ADP-ribosylation) and Mg²⁺ ions on chromatin structure revealed by scanning force microscopy." *Biochemistry* **40**(37): 10947-55.
- Dalal, R. V., M. H. Larson, K. C. Neuman, J. Gelles, R. Landick et S. M. Block (2006). "Pulling on the nascent RNA during transcription does not alter kinetics of elongation or ubiquitous pausing." *Mol Cell* **23**(2): 231-9.
- Damelin, M., I. Simon, T. I. Moy, B. Wilson, S. Komili, P. Tempst, F. P. Roth, R. A. Young, B. R. Cairns et P. A. Silver (2002). "The genome-wide localization of Rsc9, a component of the RSC chromatin-remodeling complex, changes in response to stress." *Mol Cell* **9**(3): 563-73.
- Dang, W. et B. Bartholomew (2007). "Domain architecture of the catalytic subunit in the ISW2-nucleosome complex." *Mol Cell Biol* **27**(23): 8306-17.
- Dang, W., M. N. Kagalwala et B. Bartholomew (2006). "Regulation of ISW2 by concerted action of histone H4 tail and extranucleosomal DNA." *Mol Cell Biol* **26**(20): 7388-96.
- Dang, W., M. N. Kagalwala et B. Bartholomew (2007). "The Dpb4 subunit of ISW2 is anchored to extranucleosomal DNA." *J Biol Chem* **282**(27): 19418-25.
- de Gennes, P. G. (1979). *Scaling Concepts in Polymer Physics*, Cornell University Press.
- de la Barre, A. E., D. Angelov, A. Molla et S. Dimitrov (2001). "The N-terminus of histone H2B, but not that of histone H3 or its phosphorylation, is essential for chromosome condensation." *Embo J* **20**(22): 6383-93.
- de la Barre, A. E., V. Gerson, S. Gout, M. Creaven, C. D. Allis et S. Dimitrov (2000). "Core histone N-termini play an essential role in mitotic chromosome condensation." *Embo J* **19**(3): 379-91.
- Dechassa, M. L., B. Zhang, R. Horowitz-Scherer, J. Persinger, C. L. Woodcock, C. L. Peterson et B. Bartholomew (2008). "Architecture of the SWI/SNF-Nucleosome Complex." *Mol Cell Biol*.
- Depken, M. et H. Schiessel (2007). "Nucleosome shape dictates chromatin-fiber structure." *Arxiv preprint arXiv:0712.0973*.
- Dessinges, M. N., T. Lionnet, X. G. Xi, D. Bensimon et V. Croquette (2004). "Single-molecule assay reveals strand switching and enhanced processivity of UvrD." *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**(17): 6439-44.
- Dong, F. et K. E. van Holde (1991). "Nucleosome positioning is determined by the (H3-H4) 2 tetramer." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **88**(23): 10596.
- Dorigo, B., T. Schalch, K. Bystricky et T. J. Richmond (2003). "Chromatin fiber folding: requirement for the histone H4 N-terminal tail." *J Mol Biol* **327**(1): 85-96.
- Downs, J. A., S. Allard, O. Jobin-Robitaille, A. Javaheri, A. Auger, N. Bouchard, S. J. Kron, S. P. Jackson et J. Cote (2004). "Binding of chromatin-modifying activities to phosphorylated histone H2A at DNA damage sites." *Mol Cell* **16**(6): 979-90.
- Doyen, C. M., W. An, D. Angelov, V. Bondarenko, F. Mietton, V. M. Studitsky, A. Hamiche, R. G. Roeder, P. Bouvet et S. Dimitrov (2006). "Mechanism of polymerase II transcription repression by the histone variant macroH2A." *Mol Cell Biol* **26**(3): 1156-64.
- Doyen, C. M., F. Montel, T. Gautier, H. Menoni, C. Claudet, M. Delacour-Larose, D. Angelov, A. Hamiche, J. Bednar, C. Faivre-Moskalenko, P. Bouvet et S. Dimitrov (2006). "Dissection of the unusual structural and functional properties of the variant H2A.Bbd nucleosome." *Embo J* **25**(18): 4234-44.
- Du, J., I. Nasir, B. K. Benton, M. P. Kladde et B. C. Laurent (1998). "Sth1p, a *Saccharomyces cerevisiae* Snf2p/Swi2p homolog, is an essential ATPase in RSC and differs from Snf/Swi in its interactions with histones and chromatin-associated proteins." *Genetics* **150**(3): 987-1005.

- Dubochet, J., M. Adrian, J. J. Chang, J. C. Homo, J. Lepault, A. W. McDowell et P. Schultz (1988). "Cryo-electron microscopy of vitrified specimens." *Q Rev Biophys* **21**(2): 129-228.
- Dumont, S., W. Cheng, V. Serebrov, R. K. Beran, I. Tinoco, Jr., A. M. Pyle et C. Bustamante (2006). "RNA translocation and unwinding mechanism of HCV NS3 helicase and its coordination by ATP." *Nature* **439**(7072): 105-8.
- Ebbert, R., A. Birkmann et H. J. Schuller (1999). "The product of the SNF2/SWI2 paralogue INO80 of *Saccharomyces cerevisiae* required for efficient expression of various yeast structural genes is part of a high-molecular-weight protein complex." *Mol Microbiol* **32**(4): 741-51.
- Eberharter, A., S. Ferrari, G. Langst, T. Straub, A. Imhof, P. Varga-Weisz, M. Wilm et P. B. Becker (2001). "Acf1, the largest subunit of CHRAC, regulates ISWI-induced nucleosome remodelling." *Embo J* **20**(14): 3781-8.
- Eickbush, T. H. et E. N. Moudrianakis (1978). "The histone core complex: an octamer assembled by two sets of protein-protein interactions." *Biochemistry* **17**(23): 4955-64.
- Eirin-Lopez, J. M., T. Ishibashi et J. Ausio (2008). "H2A.Bbd: a quickly evolving hypervariable mammalian histone that destabilizes nucleosomes in an acetylation-independent way." *Faseb J* **22**(1): 316-26.
- Eisen, J. A., K. S. Sweder et P. C. Hanawalt (1995). "Evolution of the SNF2 family of proteins: subfamilies with distinct sequences and functions." *Nucleic Acids Res* **23**(14): 2715-23.
- Elston, T. C. et G. Oster (1997). "Protein turbines. I: The bacterial flagellar motor." *Biophysical Journal* **73**(2): 703-721.
- Ercolini, E., F. Valle, J. Adamcik, G. Witz, R. Metzler, P. De Los Rios, J. Roca et G. Dietler (2007). "Fractal dimension and localization of DNA knots." *Phys Rev Lett* **98**(5): 058102.
- Erie, D. A., T. D. Yager et P. H. Hippel (1992). "The Single-Nucleotide Addition Cycle in Transcription: a Biophysical and Biochemical Perspective." *Annual Reviews in Biophysics and Biomolecular Structure* **21**(1): 379-415.
- Fan, J. Y., F. Gordon, K. Luger, J. C. Hansen et D. J. Tremethick (2002). "The essential histone variant H2A.Z regulates the equilibrium between different chromatin conformational states." *Nat Struct Biol* **9**(3): 172-6.
- Fan, J. Y., D. Rangasamy, K. Luger et D. J. Tremethick (2004). "H2A.Z alters the nucleosome surface to promote HP1 α -mediated chromatin fiber folding." *Mol Cell* **16**(4): 655-61.
- Fazzio, T. G., M. E. Gelbart et T. Tsukiyama (2005). "Two distinct mechanisms of chromatin interaction by the Isw2 chromatin remodeling complex in vivo." *Mol Cell Biol* **25**(21): 9165-74.
- Fehr, A. N., C. L. Asbury et S. M. Block (2008). "Kinesin steps do not alternate in size." *Biophys J* **94**(3): L20-2.
- Finer, J. T., R. M. Simmons et J. A. Spudich (1994). "Single myosin molecule mechanics: piconewton forces and nanometre steps." *Nature* **368**(6467): 113-9.
- Finlan, L. E., D. Sproul, I. Thomson, S. Boyle, E. Kerr, P. Perry, B. Ylstra, J. R. Chubb et W. A. Bickmore (2008). "Recruitment to the nuclear periphery can alter expression of genes in human cells." *PLoS Genet* **4**(3): e1000039.
- Fischer, C. J., A. Saha et B. R. Cairns (2007). "Kinetic Model for the ATP-Dependent Translocation of *Saccharomyces cerevisiae* RSC along Double-Stranded DNA." *Biochemistry* **46**(43): 12416-12426.
- Fisher, M. E. et A. B. Kolomeisky (2001). "Simple mechanochemistry describes the dynamics of kinesin molecules." *Proceedings of the National Academy of Sciences*: 141080498.
- Flanagan, J. F. et C. L. Peterson (1999). "A role for the yeast SWI/SNF complex in DNA replication." *Nucleic Acids Res* **27**(9): 2022-8.
- Flaus, A. et T. Owen-Hughes (2003). "Dynamic properties of nucleosomes during thermal and ATP-driven mobilization." *Mol Cell Biol* **23**(21): 7767-79.
- Flaus, A. et T. Owen-Hughes (2003). "Mechanisms for nucleosome mobilization." *Biopolymers* **68**(4): 563-78.
- Flaus, A., C. Rencurel, H. Ferreira, N. Wiechens et T. Owen-Hughes (2004). "Sin mutations alter inherent nucleosome mobility." *Embo J* **23**(2): 343-53.
- Folco, H. D., A. L. Pidoux, T. Urano et R. C. Allshire (2008). "Heterochromatin and RNAi are required to establish CENP-A chromatin at centromeres." *Science* **319**(5859): 94-7.
- Foltz, D. R., L. E. Jansen, B. E. Black, A. O. Bailey, J. R. Yates, 3rd et D. W. Cleveland (2006). "The human CENP-A centromeric nucleosome-associated complex." *Nat Cell Biol* **8**(5): 458-69.
- Fraser, P. et W. Bickmore (2007). "Nuclear organization of the genome and the potential for gene regulation." *Nature* **447**(7143): 413-7.
- Futai, M., T. Noumi et M. Maeda (1989). "ATP Synthase (H⁺-ATPase): Results by Combined Biochemical and Molecular Biological Approaches." *Annual Reviews in Biochemistry* **58**(1): 111-136.
- Gaillard, C., L. S. Shlyakhtenko, Y. L. Lyubchenko et F. Strauss (2002). "Structural analysis of hemicatenated DNA loops." *BMC Struct Biol* **2**: 7.
- Gangaraju, V. K. et B. Bartholomew (2007). "Dependency of ISW1a chromatin remodeling on extranucleosomal DNA." *Mol Cell Biol* **27**(8): 3217-25.

- Gautier, T., D. W. Abbott, A. Molla, A. Verdel, J. Ausio et S. Dimitrov (2004). "Histone variant H2ABbd confers lower stability to the nucleosome." *EMBO Rep* **5**(7): 715-20.
- Gelbart, M. E., N. Bachman, J. Delrow, J. D. Boeke et T. Tsukiyama (2005). "Genome-wide identification of Isw2 chromatin-remodeling targets by localization of a catalytically inactive mutant." *Genes Dev* **19**(8): 942-54.
- Gemmen, G. J., R. Sim, K. A. Haushalter, P. C. Ke, J. T. Kadonaga et D. E. Smith (2005). "Forced unraveling of nucleosomes assembled on heterogeneous DNA using core histones, NAP-1, and ACF." *J Mol Biol* **351**(1): 89-99.
- Gerchman, S. E. et V. Ramakrishnan (1987). "Chromatin higher-order structure studied by neutron scattering and scanning transmission electron microscopy." *Proc Natl Acad Sci U S A* **84**(22): 7802-6.
- Gilbert, N. et J. Allan (2001). "Distinctive higher-order chromatin structure at mammalian centromeres." *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**(21): 11949-54.
- Gilbert, N., S. Gilchrist et W. A. Bickmore (2005). "Chromatin organization in the mammalian nucleus." *Int Rev Cytol* **242**: 283-336.
- Girasole, M., A. Cricenti, R. Generosi, G. Longo, G. Pompeo, S. Cotesta et A. Congiu-Castellano (2007). "Different membrane modifications revealed by atomic force/lateral force microscopy after doping of human pancreatic cells with Cd, Zn, or Pb." *Microsc Res Tech* **70**(10): 912-7.
- Goldmark, J. P., T. G. Fazio, P. W. Estep, G. M. Church et T. Tsukiyama (2000). "The Isw2 Chromatin Remodeling Complex Represses Early Meiotic Genes upon Recruitment by Ume6p." *Cell* **103**(3): 423-433.
- Gonzales, R. C. et P. Wintz (1987). "Digital image processing."
- Gonzalez-Romero, R., J. Mendez, J. Ausio et J. M. Eirin-Lopez (2008). "Quickly evolving histones, nucleosome stability and chromatin folding: all about histone H2A.Bbd." *Gene* **413**(1-2): 1-7.
- Goodwin, G. H. et R. H. Nicolas (2001). "The BAH domain, polybromo and the RSC chromatin remodelling complex." *Gene* **268**(1-2): 1-7.
- Gorbalenya, A. E., E. V. Koonin, A. P. Donchenko et V. M. Blinov (1989). "Two related superfamilies of putative helicases involved in replication, recombination, repair and expression of DNA and RNA genomes." *Nucleic Acids Res* **17**(12): 4713-4730.
- Greenleaf, W. J., M. T. Woodside et S. M. Block (2007). "High-resolution, single-molecule measurements of biomolecular motion." *Annu Rev Biophys Biomol Struct* **36**: 171-90.
- Grewal, S. I. et S. C. Elgin (2007). "Transcription and RNA interference in the formation of heterochromatin." *Nature* **447**(7143): 399-406.
- Grigoryev, S. A., T. Nikitina, J. R. Pehrson, P. B. Singh et C. L. Woodcock (2004). "Dynamic relocation of epigenetic chromatin markers reveals an active role of constitutive heterochromatin in the transition from proliferation to quiescence." *J Cell Sci* **117**(Pt 25): 6153-62.
- Guillemette, B., A. R. Bataille, N. Gevry, M. Adam, M. Blanchette, F. Robert et L. Gaudreau (2005). "Variant histone H2A.Z is globally localized to the promoters of inactive yeast genes and regulates nucleosome positioning." *PLoS Biol* **3**(12): e384.
- Guthold, M., X. Zhu, C. Rivetti, G. Yang, N. H. Thomson, S. Kasas, H. G. Hansma, B. Smith, P. K. Hansma et C. Bustamante (1999). "Direct observation of one-dimensional diffusion and transcription by Escherichia coli RNA polymerase." *Biophys J* **77**(4): 2284-94.
- Gutierrez, J. L., M. Chandy, M. J. Carrozza et J. L. Workman (2007). "Activation domains drive nucleosome eviction by SWI/SNF." *Embo J* **26**(3): 730-40.
- Hackl, E. V., S. V. Kornilova et Y. P. Blagoi (2005). "DNA structural transitions induced by divalent metal ions in aqueous solutions." *International Journal of Biological Macromolecules* **35**(3-4): 175-191.
- Hackney, D. D. (1988). "Kinesin ATPase: Rate-Limiting ADP Release." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **85**(17): 6314-6318.
- Hake, S. B. et C. D. Allis (2006). "Histone H3 variants and their potential role in indexing mammalian genomes: the 'H3 barcode hypothesis'." *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**(17): 6428-35.
- Hake, S. B., B. A. Garcia, E. M. Duncan, M. Kauer, G. Dellaire, J. Shabanowitz, D. P. Bazett-Jones, C. D. Allis et D. F. Hunt (2006). "Expression patterns and post-translational modifications associated with mammalian histone H3 variants." *J Biol Chem* **281**(1): 559-68.
- Hamiche, A., R. Sandaltzopoulos, D. A. Gdula et C. Wu (1999). "ATP-dependent histone octamer sliding mediated by the chromatin remodeling complex NURF." *Cell* **97**(7): 833-42.
- Hammit, A., H. M. Pollock, M. Reading, M. Claybourn, P. H. Turner et K. Jewkes (1999). "Photothermal FT-IR Spectroscopy: A Step Towards FT-IR Microscopy at a Resolution Better Than the Diffraction Limit."
- Hansma, H. G., M. Bezanilla, F. Zenhausern, M. Adrian et R. L. Sinsheimer (1993). "Atomic force microscopy of DNA in aqueous solutions." *Nucleic Acids Res* **21**(3): 505-12.

- Hansma, H. G. et D. E. Laney (1996). "DNA binding to mica correlates with cationic radius: assay by atomic force microscopy." *Biophys J* **70**(4): 1933-9.
- Hansma, H. G., R. L. Sinsheimer, M. Q. Li et P. K. Hansma (1992). "Atomic force microscopy of single- and double-stranded DNA." *Nucleic Acids Res* **20**(14): 3585-90.
- Hansma, H. G., J. Vesenka, C. Siegerist, G. Kelderman, H. Morrett, R. L. Sinsheimer, V. Elings, C. Bustamante et P. K. Hansma (1992). "Reproducible imaging and dissection of plasmid DNA under liquid with the atomic force microscope." *Science* **256**(5060): 1180-4.
- Heinz, W. F. et J. H. Hoh (1999). "Spatially resolved force spectroscopy of biological surfaces using the atomic force microscope." *Trends in Biotechnology* **17**(4): 143-150.
- Henikoff, S. et K. Ahmad (2005). "Assembly of variant histones into chromatin." *Annu Rev Cell Dev Biol* **21**: 133-53.
- Henikoff, S. et Y. Dalal (2005). "Centromeric chromatin: what makes it unique?" *Curr Opin Genet Dev* **15**(2): 177-84.
- Herbert, K. M., A. La Porta, B. J. Wong, R. A. Mooney, K. C. Neuman, R. Landick et S. M. Block (2006). "Sequence-resolved detection of pausing by single RNA polymerase molecules." *Cell* **125**(6): 1083-94.
- Hirano, T. et J. Mitchison (1993). "Topoisomerase II Does Not Play a Scaffolding Role in the Organization of Mitotic Chromosomes Assembled in *Xenopus* Egg Extracts." *The Journal of Cell Biology* **120**(3): 601-612.
- Hirose, K., A. Lockhart, R. A. Cross et L. A. Amos (1996). "Three-dimensional cryoelectron microscopy of dimeric kinesin and ncd motor domains on microtubules." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **93**(18): 9539.
- Hirschhorn, J. N., S. A. Brown, C. D. Clark et F. Winston (1992). "Evidence that SNF2/SWI2 and SNF5 activate transcription in yeast by altering chromatin structure." *Genes Dev* **6**(12A): 2288-98.
- Hoh, J. H. (1994). Surface morphology and mechanical properties of MDCK monolayers by atomic force microscopy. **107**: 1105-1114.
- Holstege, F. C., E. G. Jennings, J. J. Wyrick, T. I. Lee, C. J. Hengartner, M. R. Green, T. R. Golub, E. S. Lander et R. A. Young (1998). "Dissecting the regulatory circuitry of a eukaryotic genome." *Cell* **95**(5): 717-28.
- Horcas, I., R. Fernández, J. M. Gómez-Rodríguez, J. Colchero, J. Gómez-Herrero et A. M. Baro (2007). "WSXM: A software for scanning probe microscopy and a tool for nanotechnology." *Review of Scientific Instruments* **78**: 013705.
- Horn, P. J., K. A. Crowley, L. M. Carruthers, J. C. Hansen et C. L. Peterson (2002). "The SIN domain of the histone octamer is essential for intramolecular folding of nucleosomal arrays." *Nat Struct Biol* **9**(3): 167-71.
- Horowitz, R. A., D. A. Agard, J. W. Sedat et C. L. Woodcock (1994). "The three-dimensional architecture of chromatin in situ: electron tomography reveals fibers composed of a continuously variable zig-zag nucleosomal ribbon." *J Cell Biol* **125**(1): 1-10.
- Houchmandzadeh, B. et S. Dimitrov (1999). "Elasticity measurements show the existence of thin rigid cores inside mitotic chromosomes." *J Cell Biol* **145**(2): 215-23.
- Hsu, J. M., J. Huang, P. B. Meluh et B. C. Laurent (2003). "The yeast RSC chromatin-remodeling complex is required for kinetochore function in chromosome segregation." *Mol Cell Biol* **23**(9): 3202-15.
- Huang, J., J. M. Hsu et B. C. Laurent (2004). "The RSC nucleosome-remodeling complex is required for Cohesin's association with chromosome arms." *Mol Cell* **13**(5): 739-50.
- Ingold, A. L. (1988). "Inhibition of kinesin-driven microtubule motility by monoclonal antibodies to kinesin heavy chains." *The Journal of Cell Biology* **107**(6): 2657-2667.
- Ito, T., M. E. Levenstein, D. V. Fyodorov, A. K. Kutach, R. Kobayashi et J. T. Kadonaga (1999). "ACF consists of two subunits, Acf1 and ISWI, that function cooperatively in the ATP-dependent catalysis of chromatin assembly." *Genes Dev* **13**(12): 1529-39.
- Izban, M. G. et D. S. Luse (1991). "Transcription on nucleosomal templates by RNA polymerase II in vitro: inhibition of elongation with enhancement of sequence-specific pausing." *Genes Dev* **5**(4): 683-96.
- Jackson, D. A., A. B. Hassan, R. J. Errington et P. R. Cook (1993). "Visualization of focal sites of transcription within human nuclei." *Embo J* **12**(3): 1059-65.
- James, P. J., M. Antognozzi, J. Tamayo, T. J. McMaster, J. M. Newton et M. J. Miles (2001). "Interpretation of Contrast in Tapping Mode AFM and Shear Force Microscopy. A Study of Nafion." *Langmuir* **17**(2): 349-360.
- Janovjak, H., K. T. Sapra, A. Kedrov et D. J. Müller (2008). "From Valleys to Ridges: Exploring the Dynamic Energy Landscape of Single Membrane Proteins." *Chemphyschem*.
- Jin, C. et G. Felsenfeld (2007). "Nucleosome stability mediated by histone variants H3.3 and H2A.Z." *Genes Dev* **21**(12): 1519-29.
- Julicher, F., A. Ajdari et J. Prost (1997). "Modeling molecular motors." *Reviews of Modern Physics* **69**(4): 1269-1281.
- Kapanidis, A. N., E. Margeat, S. O. Ho, E. Kortkhonja, S. Weiss et R. H. Ebricht (2006). "Initial transcription by RNA polymerase proceeds through a DNA-scrunching mechanism." *Science* **314**(5802): 1144-7.

- Karymov, M. A., M. Tomschik, S. H. Leuba, P. Caiafa et J. Zlatanova (2001). "DNA methylation-dependent chromatin fiber compaction in vivo and in vitro: requirement for linker histone." *FASEB J* **15**(14): 2631-41.
- Kasas, S., N. H. Thomson, B. L. Smith, H. G. Hansma, X. Zhu, M. Guthold, C. Bustamante, E. T. Kool, M. Kashlev et P. K. Hansma (1997). "Escherichia coli RNA polymerase activity observed using atomic force microscopy." *Biochemistry* **36**(3): 461-8.
- Kassabov, S. R., B. Zhang, J. Persinger et B. Bartholomew (2003). "SWI/SNF unwraps, slides, and rewraps the nucleosome." *Mol Cell* **11**(2): 391-403.
- Kasumov, A. Y., M. Kociak, S. Gueron, B. Reulet, V. T. Volkov, D. V. Klinov et H. Bouchiat (2001). "Proximity-induced superconductivity in DNA." *Science* **291**(5502): 280-2.
- Kent, N. A., N. Karabetsov, P. K. Politis et J. Mellor (2001). "In vivo chromatin remodeling by yeast ISWI homologs Isw1p and Isw2p." *Genes & Development* **15**(5): 619.
- Keptert, J. F., J. Mazurkiewicz, G. L. Heuvelman, K. F. Toth et K. Rippe (2005). "NAP1 Modulates Binding of Linker Histone H1 to Chromatin and Induces an Extended Chromatin Fiber Conformation." *Journal of Biological Chemistry* **280**(40): 34063.
- Kingston, R. E. et G. J. Narlikar (1999). "ATP-dependent remodeling and acetylation as regulators of chromatin fluidity." *Genes Dev* **13**(18): 2339-52.
- Kinosita, K., Jr., K. Adachi et H. Itoh (2004). "Rotation of F1-ATPase: how an ATP-driven molecular machine may work." *Annu Rev Biophys Biomol Struct* **33**: 245-68.
- Kinosita, K., Jr., R. Yasuda, H. Noji et K. Adachi (2000). "A rotary molecular motor that can work at near 100% efficiency." *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **355**(1396): 473-89.
- Klevan, L., N. Dattagupta, M. Hogan et D. M. Crothers (1978). "Physical studies of nucleosome assembly." *Biochemistry* **17**(21): 4533-4540.
- Kobor, M. S., S. Venkatasubrahmanyam, M. D. Meneghini, J. W. Gin, J. L. Jennings, A. J. Link, H. D. Madhani et J. Rine (2004). "A protein complex containing the conserved Swi2/Snf2-related ATPase Swr1p deposits histone variant H2A.Z into euchromatin." *PLoS Biol* **2**(5): E131.
- Koch, M. H., P. Vachette et D. I. Svergun (2003). "Small-angle scattering: a view on the properties, structures and structural changes of biological macromolecules in solution." *Q Rev Biophys* **36**(2): 147-227.
- Kolomeisky, A. B. et M. E. Fisher (2003). "A simple kinetic model describes the processivity of myosin-v." *Biophys J* **84**(3): 1642-50.
- Kolomeisky, A. B. et M. E. Fisher (2007). "Molecular motors: a theorist's perspective." *Annu. Rev. Phys. Chem* **58**: 675-695.
- Korber, P., T. Luckenbach, D. Blaschke et W. Horz (2004). "Evidence for histone eviction in trans upon induction of the yeast PHO5 promoter." *Mol Cell Biol* **24**(24): 10965-74.
- Kouzarides, T. (2007). "Chromatin modifications and their function." *Cell* **128**(4): 693-705.
- Krogan, N. J., K. Baetz, M. C. Keogh, N. Datta, C. Sawa, T. C. Kwok, N. J. Thompson, M. G. Davey, J. Pootoolal, T. R. Hughes, A. Emili, S. Buratowski, P. Hieter et J. F. Greenblatt (2004). "Regulation of chromosome stability by the histone H2A variant Htz1, the Swr1 chromatin remodeling complex, and the histone acetyltransferase NuA4." *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**(37): 13513-8.
- Krogan, N. J., M. C. Keogh, N. Datta, C. Sawa, O. W. Ryan, H. Ding, R. A. Haw, J. Pootoolal, A. Tong, V. Canadien, D. P. Richards, X. Wu, A. Emili, T. R. Hughes, S. Buratowski et J. F. Greenblatt (2003). "A Snf2 family ATPase complex required for recruitment of the histone H2A variant Htz1." *Mol Cell* **12**(6): 1565-76.
- Kühle, A., A. H. Sorensen, J. B. Zandbergen et J. Bohr (1998). "Contrast artifacts in tapping tip atomic force microscopy." *Applied Physics A: Materials Science & Processing* **66**: 329-332.
- Kulic, I. M. et H. Schiessel (2003). "Chromatin dynamics: nucleosomes go mobile through twist defects." *Phys Rev Lett* **91**(14): 148103.
- Kulic, I. M. et H. Schiessel (2003). "Nucleosome repositioning via loop formation." *Biophys J* **84**(5): 3197-211.
- Kulic, I. M. et H. Schiessel (2004). "DNA spools under tension." *Phys Rev Lett* **92**(22): 228101.
- Kull, F. J., E. P. Sablin, R. Lau, R. J. Fletterick et R. D. Vale (1996). "Crystal structure of the kinesin motor domain reveals a structural similarity to myosin." *Nature* **380**(6574): 550-555.
- Kundu, S., P. J. Horn et C. L. Peterson (2007). "SWI/SNF is required for transcriptional memory at the yeast GAL gene cluster." *Genes Dev* **21**(8): 997-1004.
- Kustatscher, G., M. Hothorn, C. Pugieux, K. Scheffzek et A. G. Ladurner (2005). "Splicing regulates NAD metabolite binding to histone macroH2A." *Nat Struct Mol Biol* **12**(7): 624-5.
- Lagarias, J. C., J. A. Reeds, M. H. Wright et P. E. Wright (1998). "Convergence properties of the Nelder-Mead simplex algorithm in low dimensions." *SIAM Journal on Optimization* **9**(1): 112-147.

- Lam, L., S. W. Lee et C. Y. Suen (1992). "Thinning methodologies-a comprehensive survey." *Pattern Analysis and Machine Intelligence, IEEE Transactions on* **14**(9): 869-885.
- Lancot, C., T. Cheutin, M. Cremer, G. Cavalli et T. Cremer (2007). "Dynamic genome architecture in the nuclear space: regulation of gene expression in three dimensions." *Nat Rev Genet* **8**(2): 104-15.
- Langst, G. et P. B. Becker (2001). "ISWI induces nucleosome sliding on nicked DNA." *Mol Cell* **8**(5): 1085-92.
- Langst, G. et P. B. Becker (2001). "Nucleosome mobilization and positioning by ISWI-containing chromatin-remodeling factors." *J Cell Sci* **114**(Pt 14): 2561-8.
- Langst, G., E. J. Bonte, D. F. Corona et P. B. Becker (1999). "Nucleosome movement by CHRAC and ISWI without disruption or trans-displacement of the histone octamer." *Cell* **97**(7): 843-52.
- Leschziner, A. E., A. Saha, J. Wittmeyer, Y. Zhang, C. Bustamante, B. R. Cairns et E. Nogales (2007). "Conformational flexibility in the chromatin remodeler RSC observed by electron microscopy and the orthogonal tilt reconstruction method." *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**(12): 4913-8.
- Li, A., J. M. Eirin-Lopez et J. Ausio (2005). "H2AX: tailoring histone H2A for chromatin-dependent genomic integrity." *Biochem Cell Biol* **83**(4): 505-15.
- Li, B., S. G. Pattenden, D. Lee, J. Gutierrez, J. Chen, C. Seidel, J. Gerton et J. L. Workman (2005). "Preferential occupancy of histone variant H2AZ at inactive promoters influences local histone modifications and chromatin remodeling." *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**(51): 18385-90.
- Li, G., M. Levitus, C. Bustamante et J. Widom (2005). "Rapid spontaneous accessibility of nucleosomal DNA." *Nat Struct Mol Biol* **12**(1): 46-53.
- Li, J., G. Langst et I. Grummt (2006). "NoRC-dependent nucleosome positioning silences rRNA genes." *Embo J* **25**(24): 5735-41.
- Lia, G., E. Praly, H. Ferreira, C. Stockdale, Y. C. Tse-Dinh, D. Dunlap, V. Croquette, D. Bensimon et T. Owen-Hughes (2006). "Direct observation of DNA distortion by the RSC complex." *Mol Cell* **21**(3): 417-25.
- Liao, J. C., Y. J. Jeong, D. E. Kim, S. S. Patel et G. Oster (2005). "Mechanochemistry of γ DNA helicase." *J Mol Biol* **350**(3): 452-75.
- Lindsay, S. M., L. A. Nagahara, T. Thundat, U. Knipping, R. L. Rill, B. Drake, C. B. Prater, A. L. Weisenhorn, S. A. Gould et P. K. Hansma (1989). "STM and AFM images of nucleosome DNA under water." *J Biomol Struct Dyn* **7**(2): 279-87.
- Lionnet, T., A. Dawid, S. Bigot, F. X. Barre, O. A. Saleh, F. Heslot, J. F. Allemand, D. Bensimon et V. Croquette (2006). "DNA mechanics as a tool to probe helicase and translocase activity." *Nucleic Acids Res* **34**(15): 4232-44.
- Lipfert, J. et S. Doniach (2007). "Small-angle X-ray scattering from RNA, proteins, and protein complexes." *Annu Rev Biophys Biomol Struct* **36**: 307-27.
- Lohman, T. M. et K. P. Bjornson (1996). "Mechanisms of Helicase-Catalyzed DNA Unwinding." *Annual Reviews in Biochemistry* **65**(1): 169-214.
- Lohr, D., R. Bash, H. Wang, J. Yodh et S. Lindsay (2007). "Using atomic force microscopy to study chromatin structure and nucleosome remodeling." *Methods* **41**(3): 333-41.
- Lomvardas, S. et D. Thanos (2001). "Nucleosome Sliding via TBP DNA Binding In Vivo." *Cell* **106**(6): 685-696.
- Lorch, Y., B. R. Cairns, M. Zhang et R. D. Kornberg (1998). "Activated RSC-nucleosome complex and persistently altered form of the nucleosome." *Cell* **94**(1): 29-34.
- Lorch, Y., J. W. LaPointe et R. D. Kornberg (1987). "Nucleosomes inhibit the initiation of transcription but allow chain elongation with the displacement of histones." *Cell* **49**(2): 203-10.
- Lorenz, C. D., M. Chandross, G. S. Grest, M. J. Stevens et E. B. Webb, 3rd (2005). "Tribological properties of alkylsilane self-assembled monolayers." *Langmuir* **21**(25): 11744-8.
- Lowary, P. T. et J. Widom (1989). "Higher-order structure of *Saccharomyces cerevisiae* chromatin." *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**(21): 8266-70.
- Lowary, P. T. et J. Widom (1997). "Nucleosome packaging and nucleosome positioning of genomic DNA." *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**(4): 1183-8.
- Lowary, P. T. et J. Widom (1998). "New DNA sequence rules for high affinity binding to histone octamer and sequence-directed nucleosome positioning." *J Mol Biol* **276**(1): 19-42.
- Lu, X. J. et W. K. Olson (2008). "3DNA: a versatile, integrated software system for the analysis, rebuilding and visualization of three-dimensional nucleic-acid structures." *Nat Protoc* **3**(7): 1213-27.
- Luger, K., A. W. Mader, R. K. Richmond, D. F. Sargent et T. J. Richmond (1997). "Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution." *Nature* **389**(6648): 251-60.
- Luk, E., N. D. Vu, K. Patteson, G. Mizuguchi, W. H. Wu, A. Ranjan, J. Backus, S. Sen, M. Lewis, Y. Bai et C. Wu (2007). "Chz1, a nuclear chaperone for histone H2AZ." *Mol Cell* **25**(3): 357-68.

- Lyubchenko, Y. L., R. E. Blankenship, A. A. Gall, S. M. Lindsay, O. Thiemann, L. Simpson et L. S. Shlyakhtenko (1996). "Atomic force microscopy of DNA, nucleoproteins and cellular complexes: the use of functionalized substrates." *Scanning Microsc Suppl* **10**: 97-107.
- Lyubchenko, Y. L., A. A. Gall et L. S. Shlyakhtenko (2001). "Atomic Force Microscopy of DNA and Protein-DNA Complexes Using Functionalized Mica Substrates." *Methods Mol. Biol* **148**: 569-578.
- Lyubchenko, Y. L., L. S. Shlyakhtenko, M. Binus, C. Gaillard et F. Strauss (2002). "Visualization of hemiknot DNA structure with an atomic force microscope." *Nucleic Acids Res* **30**(22): 4902-9.
- Maaloum, M. (2003). "A close encounter with DNA." *Eur Biophys J* **32**(6): 585-7.
- Malik, H. S. et S. Henikoff (2003). "Phylogenomics of the nucleosome." *Nat Struct Biol* **10**(11): 882-91.
- Mallik, R., B. C. Carter, S. A. Lex, S. J. King et S. P. Gross (2004). "Cytoplasmic dynein functions as a gear in response to load." *Nature* **427**(6975): 649-52.
- Mangenot, S., A. Leforestier, P. Vachette, D. Durand et F. Livolant (2002). "Salt-induced conformation and interaction changes of nucleosome core particles." *Biophys J* **82**(1 Pt 1): 345-56.
- Manne, S., P. K. Hansma, J. Massie, V. B. Elings et A. A. Gewirth (1991). "Atomic-Resolution Electrochemistry with the Atomic Force Microscope: Copper Deposition on Gold." *Science* **251**(4990): 183.
- Marilley, M., A. Sanchez-Sevilla et J. Rocca-Serra (2005). "Fine mapping of inherent flexibility variation along DNA molecules. Validation by atomic force microscopy (AFM) in buffer." *Molecular Genetics and Genomics* **274**(6): 658-670.
- Marko, J. F. (2008). "Micromechanical studies of mitotic chromosomes." *Chromosome Res* **16**(3): 469-97.
- Martin, Y., C. C. Williams et H. K. Wickramasinghe (1987). "Atomic force microscope-force mapping and profiling on a sub 100-Å scale." *Journal of Applied Physics* **61**: 4723.
- Marzluff, W. F., P. Gongidi, K. R. Woods, J. Jin et L. J. Maltais (2002). "The human and mouse replication-dependent histone genes." *Genomics* **80**(5): 487-98.
- Mateos-Langerak, J., S. Goetze, H. Leonhardt, T. Cremer, R. van Driel et C. Lanctot (2007). "Nuclear architecture: Is it important for genome function and can we prove it?" *J Cell Biochem* **102**(5): 1067-75.
- Matheron, G. (1988). *Mathematical Morphology*, London: Academic Press.
- McDowall, A. W., J. M. Smith et J. Dubochet (1986). "Cryo-electron microscopy of vitrified chromosomes in situ." *Embo J* **5**(6): 1395-402.
- McGregor, H. C. et J. Varley (1988). "Working with animal chromosomes."
- McKittrick, E., P. R. Gafken, K. Ahmad et S. Henikoff (2004). "Histone H3.3 is enriched in covalent modifications associated with active chromatin." *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**(6): 1525-30.
- Meersseman, G., S. Pennings et E. M. Bradbury (1992). "Mobile nucleosomes--a general behavior." *Embo J* **11**(8): 2951-9.
- Mengeritsky, G. et E. N. Trifonov (1983). "Nucleotide sequence-directed mapping of the nucleosomes." *Nucleic Acids Res* **11**(11): 3833-51.
- Menoni, H., D. Gasparutto, A. Hamiche, J. Cadet, S. Dimitrov, P. Bouvet et D. Angelov (2007). "ATP-dependent chromatin remodeling is required for base excision repair in conventional but not in variant H2A.Bbd nucleosomes." *Mol Cell Biol* **27**(17): 5949-56.
- Merkel, R., P. Nassoy, A. Leung, K. Ritchie et E. Evans (1999). "Energy landscapes of receptor-ligand bonds explored with dynamic force spectroscopy." *Nature* **397**(6714): 50-3.
- Mikheikin, A. L., A. Y. Lushnikov et Y. L. Lyubchenko (2006). "Effect of DNA supercoiling on the geometry of holliday junctions." *Biochemistry* **45**(43): 12998-3006.
- Millar, C. B., F. Xu, K. Zhang et M. Grunstein (2006). "Acetylation of H2AZ Lys 14 is associated with genome-wide gene activity in yeast." *Genes Dev* **20**(6): 711-22.
- Mitchell, J. A. et P. Fraser (2008). "Transcription factories are nuclear subcompartments that remain in the absence of transcription." *Genes Dev* **22**(1): 20-5.
- Mizuguchi, G., X. Shen, J. Landry, W. H. Wu, S. Sen et C. Wu (2004). "ATP-driven exchange of histone H2AZ variant catalyzed by SWR1 chromatin remodeling complex." *Science* **303**(5656): 343-8.
- Mohrmann, L. et C. P. Verrijzer (2005). "Composition and functional specificity of SWI2/SNF2 class chromatin remodeling complexes." *Biochim Biophys Acta* **1681**(2-3): 59-73.
- Molloy, J. E., J. E. Burns, J. Kendrick-Jones, R. T. Tregear et D. C. White (1995). "Movement and force produced by a single myosin head." *Nature* **378**(6553): 209-12.
- Moreira, J. M. et S. Holmberg (1999). "Transcriptional repression of the yeast CHA1 gene requires the chromatin-remodeling complex RSC." *Embo J* **18**(10): 2836-44.

- Moreno-Herrero, F., J. Colchero et A. M. Baro (2003). "DNA height in scanning force microscopy." *Ultramicroscopy* **96**(2): 167-74.
- Mou, J., D. M. Czajkowsky, Y. Zhang et Z. Shao (1995). "High-resolution atomic-force microscopy of DNA: the pitch of the double helix." *FEBS Lett* **371**(3): 279-82.
- Moukhtar, J., E. Fontaine, C. Faivre-Moskalenko et A. Arneodo (2007). "Probing Persistence in DNA Curvature Properties with Atomic Force Microscopy." *Physical Review Letters* **98**(17): 178101.
- Muchardt, C. et M. Yaniv (2001). "When the SWI/SNF complex remodels...the cell cycle." *Oncogene* **20**(24): 3067-75.
- Muhlbacher, F., H. Schiessel et C. Holm (2006). "Tail-induced attraction between nucleosome core particles." *Phys Rev E Stat Nonlin Soft Matter Phys* **74**(3 Pt 1): 031919.
- Müller, D. J., D. Fotiadis, S. Scheuring, S. A. Müller et A. Engel (1999). "Electrostatically balanced subnanometer imaging of biological specimens by atomic force microscopy." *Biophys. J* **76**: 1101-1111.
- Myong, S., I. Rasnik, C. Joo, T. M. Lohman et T. Ha (2005). "Repetitive shuttling of a motor protein on DNA." *Nature* **437**(7063): 1321-5.
- Nakamura, Y. et T. Norisuye (2004). "Scattering function for wormlike chains with finite thickness." *Journal of Polymer Science Part B Polymer Physics* **42**(8): 1398-1407.
- Narlikar, G. J., H. Y. Fan et R. E. Kingston (2002). "Cooperation between Complexes that Regulate Chromatin Structure and Transcription." *Cell* **108**(4): 475-487.
- Narlikar, G. J., M. L. Phelan et R. E. Kingston (2001). "Generation and interconversion of multiple distinct nucleosomal states as a mechanism for catalyzing chromatin fluidity." *Mol Cell* **8**(6): 1219-30.
- Naumann, R., S. M. Schiller, F. Giess, B. Grohe, K. B. Hartman, I. Kärcher, I. Köper, J. Lübken, K. Vasilev et W. Knoll (2003). "Tethered lipid bilayers on ultrahorizontal gold surfaces." *Langmuir* **19**: 5435-5443.
- Neish, A. S., S. F. Anderson, B. P. Schlegel, W. Wei et J. D. Parvin (1998). "Factors associated with the mammalian RNA polymerase II holoenzyme." *Nucleic Acids Res* **26**(3): 847-53.
- Neuman, K. C., E. A. Abbondanzieri, R. Landick, J. Gelles et S. M. Block (2003). "Ubiquitous transcriptional pausing is independent of RNA polymerase backtracking." *Cell* **115**(4): 437-47.
- Ng, H. H., F. Robert, R. A. Young et K. Struhl (2002). "Genome-wide location and regulated recruitment of the RSC nucleosome-remodeling complex." *Genes Dev* **16**(7): 806-19.
- Nicolas, R. H. et G. H. Goodwin (1996). "Molecular cloning of polybromo, a nuclear protein containing multiple domains including five bromodomains, a truncated HMG-box, and two repeats of a novel domain." *Gene* **175**(1-2): 233-40.
- Nikova, D. N., L. H. Pope, M. L. Bennink, K. A. van Leijenhorst-Groener, K. van der Werf et J. Greve (2004). "Unexpected binding motifs for subnucleosomal particles revealed by atomic force microscopy." *Biophys J* **87**(6): 4135-45.
- Noji, H., R. Yasuda, M. Yoshida et K. Kinoshita, Jr. (1997). "Direct observation of the rotation of F1-ATPase." *Nature* **386**(6622): 299-302.
- Noy, A., D. V. Vezenov et C. M. Lieber (1997). "CHEMICAL FORCE MICROSCOPY." *Annual Reviews in Materials Science* **27**(1): 381-421.
- Okada, M., I. M. Cheeseman, T. Hori, K. Okawa, I. X. McLeod, J. R. Yates, 3rd, A. Desai et T. Fukagawa (2006). "The CENP-H-I complex is required for the efficient incorporation of newly synthesized CENP-A into centromeres." *Nat Cell Biol* **8**(5): 446-57.
- Old, R. W., G. H. Callan et K. W. Gross (1977). "Localization of histone gene transcripts in newt lampbrush chromosomes by in situ hybridization." *J Cell Sci* **27**: 57-79.
- Owen-Hughes, T., R. T. Utley, J. Cote, C. L. Peterson et J. L. Workman (1996). "Persistent site-specific remodeling of a nucleosome array by transient action of the SWI/SNF complex." *Science* **273**(5274): 513-6.
- Pandey, N. B. et W. F. Marzluff (1987). "The stem-loop structure at the 3' end of histone mRNA is necessary and sufficient for regulation of histone mRNA stability." *Mol Cell Biol* **7**(12): 4557-9.
- Park, Y. J., P. N. Dyer, D. J. Tremethick et K. Luger (2004). "A new fluorescence resonance energy transfer approach demonstrates that the histone variant H2AZ stabilizes the histone octamer within the nucleosome." *J Biol Chem* **279**(23): 24274-82.
- Pastre, D., L. Hamon, F. Landousy, I. Sorel, M. O. David, A. Zozime, E. Le Cam et O. Pietrement (2006). "Anionic polyelectrolyte adsorption on mica mediated by multivalent cations: a solution to DNA imaging by atomic force microscopy under high ionic strengths." *Langmuir* **22**(15): 6651-60.
- Pastre, D., O. Pietrement, S. Fusil, F. Landousy, J. Jeusset, M. O. David, L. Hamon, E. Le Cam et A. Zozime (2003). "Adsorption of DNA to mica mediated by divalent counterions: a theoretical and experimental study." *Biophys J* **85**(4): 2507-18.

- Pehrson, J. R. et V. A. Fried (1992). "MacroH2A, a core histone containing a large nonhistone region." *Science* **257**(5075): 1398-400.
- Pérez, J., P. Vachette, D. Russo, M. Desmadril et D. Durand (2001). "Heat-induced unfolding of neocarzinostatin, a small all-[beta] protein investigated by small-angle X-ray scattering." *J Mol Biol* **308**(4): 721-743.
- Perkins, T. T., R. V. Dalal, P. G. Mitsis et S. M. Block (2003). "Sequence-dependent pausing of single lambda exonuclease molecules." *Science* **301**(5641): 1914-8.
- Perkins, T. T., H. W. Li, R. V. Dalal, J. Gelles et S. M. Block (2004). "Forward and reverse motion of single RecBCD molecules on DNA." *Biophys J* **86**(3): 1640-8.
- Peterson, C. L., A. Dingwall et M. P. Scott (1994). "Five SWI/SNF gene products are components of a large multisubunit complex required for transcriptional enhancement." *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**(8): 2905-8.
- Peterson, C. L. et C. Logie (2000). "Recruitment of chromatin remodeling machines." *J Cell Biochem* **78**(2): 179-85.
- Peterson, C. L. et J. L. Workman (2000). "Promoter targeting and chromatin remodeling by the SWI/SNF complex." *Curr Opin Genet Dev* **10**(2): 187-92.
- Peterson, C. L., Y. Zhao et B. T. Chait (1998). "Subunits of the yeast SWI/SNF complex are members of the actin-related protein (ARP) family." *J Biol Chem* **273**(37): 23641-4.
- Pham, D. L., C. Xu et J. L. Prince (2000). "CURRENT METHODS IN MEDICAL IMAGE SEGMENTATION." *Annual Reviews in Biomedical Engineering* **2**(1): 315-337.
- Phelan, M. L., S. Sif, G. J. Narlikar et R. E. Kingston (1999). "Reconstitution of a core chromatin remodeling complex from SWI/SNF subunits." *Mol Cell* **3**(2): 247-53.
- Pickering, J. P. et G. J. Vancso (1998). "Apparent contrast reversal in tapping mode atomic force microscope images on films of polystyrene-b-polyisoprene-b-polystyrene." *Polymer Bulletin* **40**(4): 549-554.
- Pietrement, O., D. Pastre, F. Landousy, M. O. David, S. Fusil, L. Hamon, A. Zozime et E. Le Cam (2005). "Studying the effect of a charged surface on the interaction of bleomycin with DNA using an atomic force microscope." *Eur Biophys J* **34**(3): 200-7.
- Pisano, S., E. Marchioni, A. Galati, R. Mechelli, M. Savino et S. Cacchione (2007). "Telomeric nucleosomes are intrinsically mobile." *J Mol Biol* **369**(5): 1153-62.
- Podesta, A., L. Imperadori, W. Colnaghi, L. Finzi, P. Milani et D. Dunlap (2004). "Atomic force microscopy study of DNA deposited on poly l-ornithine-coated mica." *Journal of Microscopy* **215**(3): 236-240.
- Podesta, A., M. Indrieri, D. Brogioli, G. S. Manning, P. Milani, R. Guerra, L. Finzi et D. Dunlap (2005). "Positively Charged Surfaces Increase the Flexibility of DNA." *Biophysical Journal* **89**(4): 2558-2563.
- Polach, K. J. et J. Widom (1995). "Mechanism of protein access to specific DNA sequences in chromatin: a dynamic equilibrium model for gene regulation." *J Mol Biol* **254**(2): 130-49.
- Polach, K. J. et J. Widom (1996). "A model for the cooperative binding of eukaryotic regulatory proteins to nucleosomal target sites." *J Mol Biol* **258**(5): 800-12.
- Ptacin, J. L., M. Nollmann, C. Bustamante et N. R. Cozzarelli (2006). "Identification of the FtsK sequence-recognition domain." *Nat Struct Mol Biol* **13**(11): 1023-5.
- Putman, C. A. J., B. G. De Grooth, N. F. Van Hulst et J. Greve (1992). "A detailed analysis of the optical beam deflection technique for use in atomic force microscopy." *Journal of Applied Physics* **72**: 6.
- Quinn, J., A. M. Fyrberg, R. W. Ganster, M. C. Schmidt et C. L. Peterson (1996). "DNA-binding properties of the yeast SWI/SNF complex." *Nature* **379**(6568): 844-7.
- Racki, L. R. et G. J. Narlikar (2008). "ATP-dependent chromatin remodeling enzymes: two heads are not better, just different." *Curr Opin Genet Dev* **18**(2): 137-44.
- Raisner, R. M., P. D. Hartley, M. D. Meneghini, M. Z. Bao, C. L. Liu, S. L. Schreiber, O. J. Rando et H. D. Madhani (2005). "Histone variant H2A.Z marks the 5' ends of both active and inactive genes in euchromatin." *Cell* **123**(2): 233-48.
- Rapoport, T. A. (2007). "Protein translocation across the eukaryotic endoplasmic reticulum and bacterial plasma membranes." *Nature* **450**(7170): 663-9.
- Rayment, I., H. M. Holden, M. Whittaker, C. B. Yohn, M. Lorenz, K. C. Holmes et R. A. Milligan (1993). "Structure of the actin-myosin complex and its implications for muscle contraction." *Science* **261**(5117): 58-65.
- Reeves, R. et M. S. Nissen (1990). "The A.T-DNA-binding domain of mammalian high mobility group I chromosomal proteins. A novel peptide motif for recognizing DNA structure." *J Biol Chem* **265**(15): 8573-82.
- Revyakin, A., J. F. Allemand, V. Croquette, R. H. Ebright et T. R. Strick (2003). "Single-molecule DNA nanomanipulation: detection of promoter-unwinding events by RNA polymerase." *Methods Enzymol* **370**: 577-98.
- Revyakin, A., R. H. Ebright et T. R. Strick (2004). "Promoter unwinding and promoter clearance by RNA polymerase: detection by single-molecule DNA nanomanipulation." *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**(14): 4776-80.

- Revyakin, A., C. Liu, R. H. Ebright et T. R. Strick (2006). "Abortive initiation and productive initiation by RNA polymerase involve DNA scrunching." *Science* **314**(5802): 1139-43.
- Rice, P. A., S. Yang, K. Mizuuchi et H. A. Nash (1996). "Crystal structure of an IHF-DNA complex: a protein-induced DNA U-turn." *Cell* **87**(7): 1295-306.
- Richmond, T. J. et C. A. Davey (2003). "The structure of DNA in the nucleosome core." *Nature* **423**: 145-150.
- Rivetti, C. et S. Codeluppi (2001). "Accurate length determination of DNA molecules visualized by atomic force microscopy: evidence for a partial B- to A-form transition on mica." *Ultramicroscopy* **87**(1-2): 55-66.
- Rivetti, C., M. Guthold et C. Bustamante (1996). "Scanning force microscopy of DNA deposited onto mica: equilibration versus kinetic trapping studied by statistical polymer chain analysis." *J Mol Biol* **264**(5): 919-32.
- Roberts, C. W. et S. H. Orkin (2004). "The SWI/SNF complex--chromatin and cancer." *Nat Rev Cancer* **4**(2): 133-42.
- Robinson, P. J., L. Fairall, V. A. Huynh et D. Rhodes (2006). "EM measurements define the dimensions of the "30-nm" chromatin fiber: evidence for a compact, interdigitated structure." *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**(17): 6506-11.
- Rock, R. S., S. E. Rice, A. L. Wells, T. J. Purcell, J. A. Spudich et H. L. Sweeney (2001). "Myosin VI is a processive motor with a large step size." *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**(24): 13655-9.
- Rogakou, E. P., W. Nieves-Neira, C. Boon, Y. Pommier et W. M. Bonner (2000). "Initiation of DNA fragmentation during apoptosis induces phosphorylation of H2AX histone at serine 139." *J Biol Chem* **275**(13): 9390-5.
- Ruscio, J. Z. et A. Onufriev (2006). "A Computational Study of Nucleosomal DNA Flexibility." *Biophysical Journal* **91**(11): 4121.
- Ruthenburg, A. J., H. Li, D. J. Patel et C. D. Allis (2007). "Multivalent engagement of chromatin modifications by linked binding modules." *Nat Rev Mol Cell Biol* **8**(12): 983-94.
- Saha, A., J. Wittmeyer et B. R. Cairns (2002). "Chromatin remodeling by RSC involves ATP-dependent DNA translocation." *Genes Dev* **16**(16): 2120-34.
- Saha, A., J. Wittmeyer et B. R. Cairns (2005). "Chromatin remodeling through directional DNA translocation from an internal nucleosomal site." *Nat Struct Mol Biol* **12**(9): 747-55.
- Saha, A., J. Wittmeyer et B. R. Cairns (2006). "Chromatin remodelling: the industrial revolution of DNA around histones." *Nat Rev Mol Cell Biol* **7**(6): 437-47.
- Saleh, O. A., C. Perals, F. X. Barre et J. F. Allemand (2004). "Fast, DNA-sequence independent translocation by FtsK in a single-molecule experiment." *Embo J* **23**(12): 2430-9.
- Sanders, S. L., J. Jennings, A. Canutescu, A. J. Link et P. A. Weil (2002). "Proteomics of the eukaryotic transcription machinery: identification of proteins associated with components of yeast TFIID by multidimensional mass spectrometry." *Mol Cell Biol* **22**(13): 4723-38.
- Sandman, K., S. L. Pereira et J. N. Reeve (1998). "Diversity of prokaryotic chromosomal proteins and the origin of the nucleosome." *Cell Mol Life Sci* **54**(12): 1350-64.
- Santisteban, M. S., T. Kalashnikova et M. M. Smith (2000). "Histone H2A.Z regulates transcription and is partially redundant with nucleosome remodeling complexes." *Cell* **103**(3): 411-22.
- Sarma, K. et D. Reinberg (2005). "Histone variants meet their match." *Nat Rev Mol Cell Biol* **6**(2): 139-49.
- Scheuring, S., F. Reiss-Husson, A. Engel, J. L. Rigaud et J. L. Ranck (2001). "High-resolution AFM topographs of Rubrivivax gelatinosus light-harvesting complex LH2." *The EMBO Journal* **20**: 3029-3035.
- Scheuring, S., P. Ringler, M. Borgnia, H. Stahlberg, D. J. Müller, P. Agre et A. Engel (1999). "High resolution AFM topographs of the Escherichia coli water channel aquaporin Z." *The EMBO Journal* **18**: 4981-4987.
- Scheuring, S., J. Seguin, S. Marco, D. Lévy, C. Breyton, B. Robert et J. L. Rigaud (2003). "AFM Characterization of Tilt and Intrinsic Flexibility of Rhodospirillum rubrum Light Harvesting Complex 2 (LH2)." *Journal of Molecular Biology* **325**(3): 569-580.
- Scheuring, S., J. Seguin, S. Marco, D. Levy, B. Robert et J. L. Rigaud (2003). "Nanodissection and high-resolution imaging of the Rhodospirillum rubrum photosynthetic core complex in native membranes by AFM." *Proceedings of the National Academy of Sciences* **100**(4): 1690.
- Schiessel, H. (2003). "The physics of chromatin." *J. Phys.: Condens. Matter* **15**: R699-R774.
- Schiessel, H. (2006). "The nucleosome: a transparent, slippery, sticky and yet stable DNA-protein complex." *Eur Phys J E Soft Matter* **19**(3): 251-62.
- Schnitzer, M. J. et S. M. Block (1997). "Kinesin hydrolyses one ATP per 8-nm step." *Nature* **388**(6640): 386-90.
- Schnitzer, M. J., K. Visscher et S. M. Block (2000). "Force production by single kinesin motors." *Nat Cell Biol* **2**(10): 718-23.
- Schnitzler, G. R., C. L. Cheung, J. H. Hafner, A. J. Saurin, R. E. Kingston et C. M. Lieber (2001). "Direct imaging of human SWI/SNF-remodeled mono- and polynucleosomes by atomic force microscopy employing carbon nanotube tips." *Mol Cell Biol* **21**(24): 8504-11.

- Scholey, J. M., J. Heuser, J. T. Yang et L. S. B. Goldstein (1989). "Identification of globular mechanochemical heads of kinesin." *Nature* **338**(6213): 355-357.
- Scipioni, A., G. Zuccheri, C. Anselmi, A. Bergia, B. Samori et P. De Santis (2002). "Sequence-Dependent DNA Dynamics by Scanning Force Microscopy Time-Resolved Imaging." *Chemistry & Biology* **9**(12): 1315-1321.
- Segal, E., Y. Fondufe-Mittendorf, L. Chen, A. Thastrom, Y. Field, I. K. Moore, J. P. Wang et J. Widom (2006). "A genomic code for nucleosome positioning." *Nature* **442**(7104): 772-8.
- Serra, J. (1983). *Image Analysis and Mathematical Morphology*, Academic Press, Inc. Orlando, FL, USA.
- Serra, J. (1988). "Image Analysis and Mathematical Morphology, Part II: Theoretical Advances London." *UK: Academic*.
- Shaevitz, J. W., E. A. Abbondanzieri, R. Landick et S. M. Block (2003). "Backtracking by single RNA polymerase molecules observed at near-base-pair resolution." *Nature* **426**(6967): 684-7.
- Shaevitz, J. W., S. M. Block et M. J. Schnitzer (2005). "Statistical Kinetics of Macromolecular Dynamics." *Biophysical Journal* **89**(4): 2277-2285.
- Sharma, S., F. Ding et N. V. Dokholyan (2007). "Multiscale Modeling of Nucleosome Dynamics." *Biophysical Journal* **92**(5): 1457.
- Shen, X., G. Mizuguchi, A. Hamiche et C. Wu (2000). "A chromatin remodelling complex involved in transcription and DNA processing." *Nature* **406**(6795): 541-4.
- Shlyakhtenko, L. S., A. A. Gall, A. Filonov, Z. Cerovac, A. Lushnikov et Y. L. Lyubchenko (2003). "Silatrane-based surface chemistry for immobilization of DNA, protein-DNA complexes and other biological materials." *Ultramicroscopy* **97**(1-4): 279-87.
- Shlyakhtenko, L. S., A. A. Gall, J. J. Weimer, D. D. Hawn et Y. L. Lyubchenko (1999). "Atomic Force Microscopy Imaging of DNA Covalently Immobilized on a Functionalized Mica Substrate." *Biophysical Journal* **77**(1): 568-576.
- Shundrovsky, A., C. L. Smith, J. T. Lis, C. L. Peterson et M. D. Wang (2006). "Probing SWI/SNF remodeling of the nucleosome by unzipping single DNA molecules." *Nat Struct Mol Biol* **13**(6): 549-54.
- Smith, C. L. et C. L. Peterson (2005). "ATP-dependent chromatin remodeling." *Curr Top Dev Biol* **65**: 115-48.
- Smith, D. E., S. J. Tans, S. B. Smith, S. Grimes, D. L. Anderson et C. Bustamante (2001). "The bacteriophage straight phi29 portal motor can package DNA against a large internal force." *Nature* **413**(6857): 748-52.
- Soille, P. (1999). *Morphological Image Analysis*, Heidelberg, New York: Springer-Verlag.
- Sorel, I., O. Pietrement, L. Hamon, S. Baconnais, E. L. Cam et D. Pastre (2006). "The EcoRI-DNA complex as a model for investigating protein-DNA interactions by atomic force microscopy." *Biochemistry* **45**(49): 14675-82.
- Spencer, M. et D. Z. Staynov (1980). "Interparticle effects in low-angle x-ray and neutron diffraction from chromatin." *Biophys J* **30**(2): 307-16.
- Stiff, T., M. O'Driscoll, N. Rief, K. Iwabuchi, M. Lohrich et P. A. Jeggo (2004). "ATM and DNA-PK function redundantly to phosphorylate H2AX after exposure to ionizing radiation." *Cancer Res* **64**(7): 2390-6.
- Stockdale, C., M. Bruno, H. Ferreira, E. Garcia-Wilson, N. Wiechens, M. Engholm, A. Flaus et T. Owen-Hughes (2006). "Nucleosome dynamics." *Biochem Soc Symp*(73): 109-19.
- Stokes, D. G., K. D. Tartof et R. P. Perry (1996). "CHD1 is concentrated in interbands and puffed regions of Drosophila polytene chromosomes." *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**(14): 7137-42.
- Strick, T. R., V. Croquette et D. Bensimon (2000). "Single-molecule analysis of DNA uncoiling by a type II topoisomerase." *Nature* **404**(6780): 901-4.
- Stroh, C., H. Wang, R. Bash, B. Ashcroft, J. Nelson, H. Gruber, D. Lohr, S. M. Lindsay et P. Hinterdorfer (2004). "Single-molecule recognition imaging microscopy." *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**(34): 12503-7.
- Strohner, R., A. Nemeth, P. Jansa, U. Hofmann-Rohrer, R. Santoro, G. Langst et I. Grummt (2001). "NoRC--a novel member of mammalian ISWI-containing chromatin remodeling machines." *Embo J* **20**(17): 4892-900.
- Sudarsanam, P. et F. Winston (2000). "The Swi/Snf family nucleosome-remodeling complexes and transcriptional control." *Trends Genet* **16**(8): 345-51.
- Sushko, M. L., A. L. Shluger et C. Rivetti (2006). "Simple model for DNA adsorption onto a mica surface in 1:1 and 2:1 electrolyte solutions." *Langmuir* **22**(18): 7678-88.
- Suto, R. K., M. J. Clarkson, D. J. Tremethick et K. Luger (2000). "Crystal structure of a nucleosome core particle containing the variant histone H2A.Z." *Nat Struct Biol* **7**(12): 1121-4.
- Svoboda, K. et S. M. Block (1994). "Force and velocity measured for single kinesin molecules." *Cell* **77**(5): 773-84.
- Svoboda, K., C. F. Schmidt, B. J. Schnapp et S. M. Block (1993). "Direct observation of kinesin stepping by optical trapping interferometry." *Nature* **365**(6448): 721-7.

- Tagami, H., D. Ray-Gallet, G. Almouzni et Y. Nakatani (2004). "Histone H3.1 and H3.3 complexes mediate nucleosome assembly pathways dependent or independent of DNA synthesis." *Cell* **116**(1): 51-61.
- Thastrom, A., P. T. Lowary, H. R. Widlund, H. Cao, M. Kubista et J. Widom (1999). "Sequence motifs and free energies of selected natural and non-natural nucleosome positioning DNA sequences." *J Mol Biol* **288**(2): 213-29.
- Thomas, J. O. et P. Oudet (1979). "Complexes of the arginine-rich histone tetramer (H3) 2 (H4) 2 with negatively supercoiled DNA: electron microscopy and chemical cross-linking." *Nucleic Acids Research* **7**(3): 611.
- Tiner, W. J., Sr., V. N. Potaman, R. R. Sinden et Y. L. Lyubchenko (2001). "The structure of intramolecular triplex DNA: atomic force microscopy study." *J Mol Biol* **314**(3): 353-7.
- Toba, S., T. M. Watanabe, L. Yamaguchi-Okimoto, Y. Y. Toyoshima et H. Higuchi (2006). "Overlapping hand-over-hand mechanism of single molecular motility of cytoplasmic dynein." *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**(15): 5741-5.
- Tomschik, M., K. van Holde et J. Zlatanova (2008). "Nucleosome Dynamics as Studied by Single-pair Fluorescence Resonance Energy Transfer: A Reevaluation." *J Fluoresc.*
- Tomschik, M., H. Zheng, K. van Holde, J. Zlatanova et S. H. Leuba (2005). "Fast, long-range, reversible conformational fluctuations in nucleosomes revealed by single-pair fluorescence resonance energy transfer." *Proceedings of the National Academy of Sciences* **102**(9): 3278.
- Tong, J. K., C. A. Hassig, G. R. Schnitzler, R. E. Kingston et S. L. Schreiber (1998). "Chromatin deacetylation by an ATP-dependent nucleosome remodelling complex." *Nature* **395**(6705): 917-21.
- Tran, H. G., D. J. Steger, V. R. Iyer et A. D. Johnson (2000). "The chromo domain protein chd1p from budding yeast is an ATP-dependent chromatin-modifying factor." *Embo J* **19**(10): 2323-31.
- Tsuchiya, E., T. Hosotani et T. Miyakawa (1998). "A mutation in NPS1/STH1, an essential gene encoding a component of a novel chromatin-remodeling complex RSC, alters the chromatin structure of *Saccharomyces cerevisiae* centromeres." *Nucleic Acids Res* **26**(13): 3286-92.
- Tsukiyama, T. et C. Wu (1997). "Chromatin remodeling and transcription." *Curr Opin Genet Dev* **7**(2): 182-91.
- Tyler, J. K. et J. T. Kadonaga (1999). "The "dark side" of chromatin remodeling: repressive effects on transcription." *Cell* **99**(5): 443-6.
- Ulyanova, N. P. et G. R. Schnitzler (2005). "Human SWI/SNF generates abundant, structurally altered dinucleosomes on polynucleosomal templates." *Mol Cell Biol* **25**(24): 11156-70.
- Valle, F., M. Favre, P. De Los Rios, A. Rosa et G. Dietler (2005). "Scaling exponents and probability distributions of DNA end-to-end distance." *Phys Rev Lett* **95**(15): 158105.
- Van Noort, S. J. T., K. O. Van der Werf, B. G. De Grooth, N. F. Van Hulst et J. Greve (1997). "Height anomalies in tapping mode atomic force microscopy in air caused by adhesion." *Ultramicroscopy* **69**(2): 117-127.
- Varga-Weisz, P. D., M. Wilm, E. Bonte, K. Dumas, M. Mann et P. B. Becker (1997). "Chromatin-remodelling factor CHRAC contains the ATPases ISWI and topoisomerase II." *Nature* **388**(6642): 598-602.
- Venter, J. C., M. D. Adams, E. W. Myers, P. W. Li, R. J. Mural, G. G. Sutton, H. O. Smith, M. Yandell, C. A. Evans et R. A. Holt (2001). The Sequence of the Human Genome. **291**: 1304-1351.
- Villarrubia, J. S. (1997). "Algorithms for scanned probe microscope image simulation, surface reconstruction, and tip estimation." *Journal of Research of the National Institute of Standards and Technology* **102**(4): 425-454.
- Visscher, K., M. J. Schnitzer et S. M. Block (1999). "Single kinesin molecules studied with a molecular force clamp." *Nature* **400**(6740): 184-9.
- Wade, P. A., A. Geggion, P. L. Jones, E. Ballestar, F. Aubry et A. P. Wolffe (1999). "Mi-2 complex couples DNA methylation to chromatin remodelling and histone deacetylation." *Nat Genet* **23**(1): 62-6.
- Wang, H., R. Bash, S. M. Lindsay et D. Lohr (2005). "Solution AFM studies of human Swi-Snf and its interactions with MMTV DNA and chromatin." *Biophys J* **89**(5): 3386-98.
- Wang, H., R. Bash, J. G. Yodh, G. Hager, S. M. Lindsay et D. Lohr (2004). "Using atomic force microscopy to study nucleosome remodeling on individual nucleosomal arrays in situ." *Biophys J* **87**(3): 1964-71.
- Wang, H., R. Bash, J. G. Yodh, G. L. Hager, D. Lohr et S. M. Lindsay (2002). "Glutaraldehyde modified mica: a new surface for atomic force microscopy of chromatin." *Biophys J* **83**(6): 3619-25.
- Wang, H. B. et Y. Zhang (2001). "Mi2, an auto-antigen for dermatomyositis, is an ATP-dependent nucleosome remodeling factor." *Nucleic Acids Res* **29**(12): 2517-21.
- Wang, H. Y., T. Elston, A. Mogilner et G. Oster (1998). "Force generation in RNA polymerase." *Biophys J* **74**(3): 1186-202.
- Wang, M. D., M. J. Schnitzer, H. Yin, R. Landick, J. Gelles et S. M. Block (1998). "Force and Velocity Measured for Single Molecules of RNA Polymerase." *Science* **282**(5390): 902.

- Wang, W., J. Cote, Y. Xue, S. Zhou, P. A. Khavari, S. R. Biggar, C. Muchardt, G. V. Kalpana, S. P. Goff, M. Yaniv, J. L. Workman et G. R. Crabtree (1996). "Purification and biochemical heterogeneity of the mammalian SWI-SNF complex." *Embo J* **15**(19): 5370-82.
- Wang, W., Y. Xue, S. Zhou, A. Kuo, B. R. Cairns et G. R. Crabtree (1996). "Diversity and specialization of mammalian SWI/SNF complexes." *Genes Dev* **10**(17): 2117-30.
- Wansink, D. G., W. Schul, I. van der Kraan, B. van Steensel, R. van Driel et L. de Jong (1993). "Fluorescent labeling of nascent RNA reveals transcription by RNA polymerase II in domains scattered throughout the nucleus." *J Cell Biol* **122**(2): 283-93.
- Watson, J. D. et F. H. Crick (1953). "The structure of DNA." *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **18**: 123-31.
- Whitehouse, I., A. Flaus, B. R. Cairns, M. F. White, J. L. Workman et T. Owen-Hughes (1999). "Nucleosome mobilization catalysed by the yeast SWI/SNF complex." *Nature* **400**(6746): 784-7.
- Whitehouse, I., O. J. Rando, J. Delrow et T. Tsukiyama (2007). "Chromatin remodelling at promoters suppresses antisense transcription." *Nature* **450**(7172): 1031-5.
- Widlund, H. R., H. Cao, S. Simonsson, E. Magnusson, T. Simonsson, P. E. Nielsen, J. D. Kahn, D. M. Crothers et M. Kubista (1997). "Identification and characterization of genomic nucleosome-positioning sequences." *J Mol Biol* **267**(4): 807-17.
- Widom, J. (1997). "Chromatin: the nucleosome unwrapped." *Curr Biol* **7**(10): R653-5.
- Wilson, C. J., D. M. Chao, A. N. Imbalzano, G. R. Schnitzler, R. E. Kingston et R. A. Young (1996). "RNA polymerase II holoenzyme contains SWI/SNF regulators involved in chromatin remodeling." *Cell* **84**(2): 235-44.
- Winston, F. et M. Carlson (1992). "Yeast SNF/SWI transcriptional activators and the SPT/SIN chromatin connection." *Trends Genet* **8**(11): 387-91.
- Wolffe, A. P., S. Khochbin et S. Dimitrov (1997). "What do linker histones do in chromatin?" *Bioessays* **19**(3): 249-55.
- Woodcock, C. L. (1994). "Chromatin fibers observed in situ in frozen hydrated sections. Native fiber diameter is not correlated with nucleosome repeat length." *J Cell Biol* **125**(1): 11-9.
- Wu, C. et A. Travers (2004). "A 'one-pot' assay for the accessibility of DNA in a nucleosome core particle." *Nucleic Acids Res* **32**(15): e122.
- Wu, L. et F. Winston (1997). "Evidence that Snf-Swi controls chromatin structure over both the TATA and UAS regions of the SUC2 promoter in *Saccharomyces cerevisiae*." *Nucleic Acids Res* **25**(21): 4230-4.
- Wuite, G. J., S. B. Smith, M. Young, D. Keller et C. Bustamante (2000). "Single-molecule studies of the effect of template tension on T7 DNA polymerase activity." *Nature* **404**(6773): 103-6.
- Xing, J., J. C. Liao et G. Oster (2005). "Making ATP." *Proceedings of the National Academy of Sciences* **102**(46): 16539-16546.
- Xing, J., H. Wang et G. Oster (2005). "From Continuum Fokker-Planck Models to Discrete Kinetic Models." *Biophysical Journal* **89**(3): 1551-1563.
- Xue, Y., J. C. Canman, C. S. Lee, Z. Nie, D. Yang, G. T. Moreno, M. K. Young, E. D. Salmon et W. Wang (2000). "The human SWI/SNF-B chromatin-remodeling complex is related to yeast rsc and localizes at kinetochores of mitotic chromosomes." *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**(24): 13015-20.
- Xue, Y., J. Wong, G. T. Moreno, M. K. Young, J. Cote et W. Wang (1998). "NURD, a novel complex with both ATP-dependent chromatin-remodeling and histone deacetylase activities." *Mol Cell* **2**(6): 851-61.
- Yakushevich, L. V. (2004). *Nonlinear physics of DNA*, Wiley-VCH, Weinheim.
- Yang, J. T., W. M. Saxton, R. J. Stewart, E. C. Raff et L. S. Goldstein (1990). "Evidence that the head of kinesin is sufficient for force generation and motility in vitro." *Science* **249**(4964): 42-47.
- Yasuda, R., H. Noji, K. Kinoshita, Jr. et M. Yoshida (1998). "F1-ATPase is a highly efficient molecular motor that rotates with discrete 120 degree steps." *Cell* **93**(7): 1117-24.
- Yasuda, R., H. Noji, M. Yoshida, K. Kinoshita, Jr. et H. Itoh (2001). "Resolution of distinct rotational substeps by submillisecond kinetic analysis of F1-ATPase." *Nature* **410**(6831): 898-904.
- Yildiz, A., H. Park, D. Safer, Z. Yang, L. Q. Chen, P. R. Selvin et H. L. Sweeney (2004). "Myosin VI steps via a hand-over-hand mechanism with its lever arm undergoing fluctuations when attached to actin." *J Biol Chem* **279**(36): 37223-6.
- Yildiz, A. et P. R. Selvin (2005). "Fluorescence imaging with one nanometer accuracy: application to molecular motors." *Acc Chem Res* **38**(7): 574-82.
- Yildiz, A., M. Tomishige, R. D. Vale et P. R. Selvin (2004). "Kinesin walks hand-over-hand." *Science* **303**(5658): 676-8.
- Yodh, J. G., Y. L. Lyubchenko, L. S. Shlyakhtenko, N. Woodbury et D. Lohr (1999). "Evidence for nonrandom behavior in 208-12 subsaturated nucleosomal array populations analyzed by AFM." *Biochemistry* **38**(48): 15756-63.

- Yodh, J. G., N. Woodbury, L. S. Shlyakhtenko, Y. L. Lyubchenko et D. Lohr (2002). "Mapping nucleosome locations on the 208-12 by AFM provides clear evidence for cooperativity in array occupation." *Biochemistry* **41**(11): 3565-74.
- Young, R., J. Ward et F. Scire (1971). "The Topografiner: An Instrument for Measuring Surface Microtopography." *Review of Scientific Instruments* **43**: 999.
- Yuan, G. C., Y. J. Liu, M. F. Dion, M. D. Slack, L. F. Wu, S. J. Altschuler et O. J. Rando (2005). "Genome-scale identification of nucleosome positions in *S. cerevisiae*." *Science* **309**(5734): 626-30.
- Zhang, H., D. N. Roberts et B. R. Cairns (2005). "Genome-wide dynamics of Htz1, a histone H2A variant that poises repressed/basal promoters for activation through histone loss." *Cell* **123**(2): 219-31.
- Zhang, R., M. V. Poustovoitov, X. Ye, H. A. Santos, W. Chen, S. M. Daganzo, J. P. Erzberger, I. G. Serebriiskii, A. A. Canutescu, R. L. Dunbrack, J. R. Pehrson, J. M. Berger, P. D. Kaufman et P. D. Adams (2005). "Formation of MacroH2A-containing senescence-associated heterochromatin foci and senescence driven by ASF1a and HIRA." *Dev Cell* **8**(1): 19-30.
- Zhang, Y., G. LeRoy, H. P. Seelig, W. S. Lane et D. Reinberg (1998). "The dermatomyositis-specific autoantigen Mi2 is a component of a complex containing histone deacetylase and nucleosome remodeling activities." *Cell* **95**(2): 279-89.
- Zhang, Y., H. H. Ng, H. Erdjument-Bromage, P. Tempst, A. Bird et D. Reinberg (1999). "Analysis of the NuRD subunits reveals a histone deacetylase core complex and a connection with DNA methylation." *Genes Dev* **13**(15): 1924-35.
- Zhang, Y., S. Sheng et Z. Shao (1996). "Imaging biological structures with the cryo atomic force microscope." *Biophysical Journal* **71**(4): 2168.
- Zhang, Y., C. L. Smith, A. Saha, S. W. Grill, S. Mihardja, S. B. Smith, B. R. Cairns, C. L. Peterson et C. Bustamante (2006). "DNA translocation and loop formation mechanism of chromatin remodeling by SWI/SNF and RSC." *Mol Cell* **24**(4): 559-68.
- Zhou, J., J. Y. Fan, D. Rangasamy et D. J. Tremethick (2007). "The nucleosome surface regulates chromatin compaction and couples it with transcriptional repression." *Nat Struct Mol Biol* **14**(11): 1070-6.
- Zhou, Y. B., S. E. Gerchman, V. Ramakrishnan, A. Travers et S. Muyldermans (1998). "Position and orientation of the globular domain of linker histone H5 on the nucleosome." *Nature* **395**(6700): 402-5.
- Zlatanova, J. et S. H. Leuba (2003). "Chromatin fibers, one-at-a-time." *J Mol Biol* **331**(1): 1-19.
- Zlatanova, J., C. Seebart et M. Tomschik (2007). "Nap1: taking a closer look at a juggler protein of extraordinary skills." *FASEB J* **21**(7): 1294-310.
- Zofall, M., J. Persinger, S. R. Kassabov et B. Bartholomew (2006). "Chromatin remodeling by ISW2 and SWI/SNF requires DNA translocation inside the nucleosome." *Nat Struct Mol Biol* **13**(4): 339-46.

Annexe :

Protocoles expérimentaux

Production des surfaces d'AP-mica

Matériel :

- Une pince fine recourbée
- Un rouleau de scotch invisible
- Un lot de disque de mica de type rubis muscovite grade V-1 (diamètre 9 mm)
- Un porte échantillon pour dessiccateur en PTFE
- Un dessiccateur en verre de 2L doté d'une entrée pour le gaz
- Une bouteille d'argon ultrapure
- Une seringue de 1mL et une aiguille de
- Un bouchon de tube Falcon 5 mL
- Une bouteille d'APTES ultrapure liquide conservé au sec ($RH \sim 25\%$)

- 1) Disposer à plat un disque de mica sur une surface lisse (par exemple un paillasse en verre).
- 2) Recouvrir le disque d'une longueur de scotch suffisante en s'assurant du bon contact avec le disque à l'aide de la pince recourbée.
- 3) Retirer le scotch rapidement (en tenant ou non le disque à l'aide de la pince) de manière à cliver le mica. Si l'opération est réussie le mica est séparé en deux parties (l'une sur le scotch et l'autre qui est restée sur le support) et la surface du mica clivé présente un aspect uniforme (pas de marches de mica visibles à l'œil nu). Dans le cas contraire on recommence l'opération sur le même disque jusqu'à obtenir un tel résultat.
- 4) Déposer le disque clivé dans le porte échantillon de manière à ce que la face clivée ne touche aucune surface.
- 5) Recommencer les opérations 1) à 5) pour les autres disques.
- 6) Placer le bouchon de tube Falcon au fond du dessiccateur avec la partie creuse vers le haut. Faire souffler un flux modéré d'argon à l'intérieur du dessiccateur pendant au moins 5 min.
- 7) Déposer 55 μ L d'APTES à l'aide d'une pipette dans le bouchon de tube Falcon.
- 8) Faire souffler l'argon pendant 2 min 30.
- 9) Placer le porte échantillon dans le dessiccateur.
- 10) Faire souffler l'argon pendant 2 min 30.
- 11) Fermer complètement le dessiccateur pendant 1 h 45.
- 12) Sortir le porte-échantillon du dessiccateur et le placer au sec. Les surfaces se conservent de 3 à 7 jours.
- 13) (Optionnel) Placer le porte échantillon contenant les disques dans une étuve à 75°C pendant 2 h.

Dépôt de des mono- ou oligo- nucléosomes sur surface AP-mica

Matériel :

- Une solution de mono- ou poly- nucléosome conservée à 4°C
- Une surface d'AP-mica conservée au sec (RH ~ 25%)
- Une bouteille d'azote ultrapure relié à un pistolet

- 1) Déposer 5 µL de la solution de nucléosome à ~ 10 nM au centre de la surface d'AP-mica formant une demi-bille de 3-4 mm. Si la goutte s'étale nettement sur la surface d'AP-mica (diamètre supérieur à 5-6 mm), il est probable que la fonctionnalisation de la surface s'est détériorée.
- 2) Laisser incuber pendant 1 min.
- 3) Rincer avec 1 mL d'eau ultrapure.
- 4) Sécher avec un jet d'azote à partir du centre de la surface et en guidant les gouttes vers l'extérieur.
- 5) Placer l'échantillon au sec (RH ~ 25 %). Il se conserve de 2 à 4 jours.

Production d'ADN 601 par PCR

Matériel :

- Deux solutions d'amorces (correspondantes à chacune des deux extrémités du fragment) à 100 μ M.
- Une solution de nucléotides dNTP à 25 mM
- Une solution tampon pour la polymérase PFU
- Un bloc PCR programmable réalisant 5 cycles à 59 °C / 72 °C, 35 cycles à 52 °C / 72 °C et qui se place en attente à 10 °C.
- Une solution d'acétate de sodium EtONa à 0.3 M
- Une solution d'éthanol EtOH à 100 % à -20 °C
- Une solution d'éthanol EtOH à 75 % à 4 °C
- Une seringue de 1 mL
- Un filtre papier découpé à l'emporte-pièce pour former un disque d'un diamètre légèrement supérieur à celui de la seringue.
- Une solution de bille sephadex sans SDS
- Une solution de Tris 20 mM.

- 1) On mélange 1 μ L de chacun des amorces, 0.6 μ L de plasmide, 1.2 μ L de dNTP, 10 μ L de tampon PFU, 1 μ L de PFU et 85 μ L d'eau ultrapure.
- 2) On place la solution dans le bloc PCR et on lance le programme.
- 3) On ajoute 500 μ L de chlorophénol par tube, on vortexe, on centrifuge à 13 200 rpm pendant 2 min.
- 4) On prélève le surnageant, on ajoute ~100 μ L au chlorophénol restant et on ré-extrait cette phase.
- 5) On ajoute 250 μ L d'EtONa à la phase aqueuse. On ajoute 750 μ L d'EtOH 100% à -20°C et on place à -80°C pendant 30 min.
- 6) On centrifuge pendant 10 min à 4°C, on enlève l'éthanol à la pipetman sans chercher à tout retirer. Il apparaît alors un culot blanc au fond du tube.
- 7) On re-suspend dans 750 μ L d'EtOH 75% à 4°C. On vortexe et on centrifuge pendant 5 min à 25°C. On retire l'éthanol et on fait sécher le culot sur un bloc chauffant à 37 °C pendant quelques minutes.
- 8) On prépare une seringue de 1 mL en sectionnant la partie terminale au ciseau (à ~ 0.7 μ L) et en la plaçant dans le goulot sectionné d'un tube eppendorf 1 mL.
- 9) On place le filtre à l'entrée de la seringue en le faisant entrer par la partie terminale et en le poussant avec le piston de la seringue.
- 10) On place la seringue en position verticale avec la partie terminal vers le haut. On injecte la solution de séphadex jusqu'à obtenir un lit de bille de 0.5-0.6 mL. On place la seringue dans un eppendorf de 1 mL. On centrifuge 1 min à 2000 rpm.
- 11) On élimine l'éluat et on rince le sephadex avec 50 μ L d'eau ultrapure.
- 12) On re-suspend le culot dans 50 μ L de Tris 20 mM.
- 13) On dépose la solution d'ADN obtenue sur la colonne de séphadex et on centrifuge pendant 2 min à 2200 rpm. On récupère alors ~50 μ L d'ADN que l'on peut stocker plusieurs mois à -20°C.

Reconstitution des nucléosomes par dialyse

Matériel :

- 800 mL de solutions salines à 1.6 M, 1.2 M, 1 M, 0.8 M, 0.6 M, 0.3 M et 0.1 M NaCl contenant également 10 mM Tris, 1mM EDTA et 5 mM 2-mercaptoéthanol.
- 800 mL de solution saline à 10mM NaCl.
- Un mélange d'histone (H2A, H2B, H3, H4)
- Une solution d'ADN 601
- Une solution de NaCl 5M
- Une solution de HBF (10 mM Tris, 1mM EDTA, 5mM betamercapto, 2M NaCl)
- Environ 5 cm de boudin de dialyse (bouilli pendant 30 min dans 25 mM EDTA, lavé 3 fois dans l'eau ultrapure et conservé dans 20 % EtOH, 20mM EDTA)
- Deux pinces en plastiques pour boudins de dialyse

- 1) Rincer le boudin à l'eau ultrapure.
- 2) Mélanger en quantité stœchiométrique (1 : 1) le mélange d'histone avec l'ADN de manière à avoir au final de 1 à 10 µg d'ADN.
- 3) Ajouter la quantité suffisante de NaCl et de HBF pour obtenir une solution à 2 M NaCl final.
- 4) Fermer une des extrémités du boudin à l'aide d'une pince et sécher le boudin.
- 5) Introduire le mélange dans le boudin de dialyse et refermer le boudin en prenant garde à laisser quelques millimètres d'espace libre au dessus de la solution.
- 6) Placer le boudin dans un bécher contenant la solution à 1.6M NaCl et maintenant une agitation permanente pendant 1h30.
- 7) Placer le boudin dans le bain à 1.2 M, puis, 1M,, jusqu'à 0.1 M NaCl également pendant 1h30.
- 8) Retirer le contenu du boudin. Les nucléosomes peuvent se conserver plusieurs semaines à 4°C.

Marquage streptavidine des nucléosomes

Matériel :

- Une solution de streptavidine à
- Une solution de nucléosomes
- Un filtre microcon Y200
- Une solution de TE 1X

- 1) Mélanger les nucléosomes et la streptavidine dans un ratio ~ 1 pour 1000 pendant 24h à 4°C.
- 2) (Optionnel) Rincer le filtre microcon en déposant au dessus de la membrane 60 µL de TE 1X pendant 1 min et répéter cette étape une ou deux fois.
- 3) Placer 30 µL du mélange sur un filtre microcon dans une centrifugeuse à 4°C.
- 4) Ajouter 30 µL de TE 1X et centrifuger pendant 30 s à 9000 rpm.
- 5) Répéter l'opération précédente de 2 ou 3 fois.
- 6) Récupérer la solution encore présente au dessus de la membrane du filtre microcon.
- 7) La solution de nucléosomes marqués streptavidine ainsi obtenue se conserve plusieurs jours à 4°C.

Remodelage des mono- ou oligo- nucléosomes par RSC ou SWI/SNF

Matériel :

- *Une solution de nucléosome*
- *Une solution de facteur de remodelage*
- *Une solution de $MgCl_2$ à 10 mM*
- *Une solution d'ATP à 10 mM*
- *Un bloc chauffant thermostaté*

- 1) Mélanger les solutions de nucléosomes et de facteurs de remodelage pour obtenir un rapport nucléosome / moteur de l'ordre de 40 pour 1. Dans notre cas, on utilise en général 1 μL de nucléosome pour $\sim 0.3 \mu L$ de moteur.
- 2) Ajouter l'ATP et le $MgCl_2$ de manière à obtenir une solution finale à 1 mM ATP et 1.5 mM $MgCl_2$.
- 3) Placer la solution à 29°C pendant une durée de 30 à 60 min sur le bloc chauffant.

Table des illustrations

Figure 1 : Structure de l'acide désoxyribonucléique (ADN).	11
Figure 2 : Structure de l'ADN et désordre intrinsèque.	12
Figure 3 : L'histone fold	13
Figure 4 : La formation du nucléosome	14
Figure 5 : L'histone de liaison	14
Figure 6 : Structure du nucléosome	15
Figure 7 : Modélisation de l'application d'une force de tension sur un nucléosome.	16
Figure 8 : Les modèles de fibre de 30 nm.	18
Figure 9 : L'organisation du noyau en territoires chromosomiques.	19
Figure 10 : Modèle d'organisation de la chromatine interphasique	20
Figure 11 : Représentation simplifiée des différents niveaux d'organisation de la chromatine.	21
Figure 12 : Trois voies épigénétiques modulant l'accès à l'ADN	22
Figure 13 : Propriétés des régions euchromatiques et hétérochromatiques	23
Figure 14 : Alignement des séquences des différents variants d'histones	24
Figure 15 : Effet de l'incorporation de H2A.Z sur la compaction de la fibre de chromatine.	26
Figure 16 : Implication de H2A.Z dans l'architecture des promoteurs	27
Figure 17 : Arbre phylogénique de H2A.	29
Figure 18 : H2A.Bbd, séquence et structure	30
Figure 19 : Corrélation entre présence de H2A.Bbd et zones actives de la chromatine.	31
Figure 20 : Arbre phylogénétique des hélicases ATP-dépendantes.	34
Figure 21 : Différents domaines de la sous-unité catalytique des facteurs de remodelage	35
Figure 22 : Composition des complexes de la sous-famille 'swi2/snf2'	35
Figure 23 : Différents modèles de recrutement de SWI/SNF	37
Figure 24 : Exemple de cycle catalytique : l'ATP synthase	44
Figure 25 : Suivi de particule et F1F0-ATPase	46
Figure 26 : Etude par FRET de l'hélicase Srs2.	47
Figure 27 : Principe d'un montage de pinces optiques.	48
Figure 28 : Pinces optiques et transcription	48
Figure 29 : Principe de fonctionnement d'une pince magnétique	49
Figure 30 : Exemples de deux expériences utilisant des pinces magnétiques : l'étude de la Topoisomérase II et de l'Hélicase UrvD.	50
Figure 31 : Deux types de modélisations des moteurs moléculaires.	52
Figure 32 : SWI/SNF vu comme une translocase à ADN.	54
Figure 33 : Deux modèles physiques de glissement du nucléosome	55
Figure 34 : Modèle de boucle assistée par un facteur de remodelage.	56
Figure 35 : RSC est une translocase de l'ADN.	57
Figure 36 : Désorganisation du chapelet nucléosomal par SWI/SNF.	58
Figure 37 : Etudes AFM en solution du remodelage de la chromatine et images de reconnaissance spécifique par anticorps.	59
Figure 38 : Expériences de dénaturation de l'ADN et remodelage par SWI/SNF	60
Figure 39 : Expériences de pinces optiques et remodelage par RSC	61
Figure 40 : Reconstruction à haute résolution des complexes de remodelage RSC et SWI/SNF par cryoEM	62
Figure 41 : Le profilomètre de Schmalz (1929).	66
Figure 42 : Principe de la Microscopie à Effet Tunnel (STM) et de la Microscopie à Force Atomique (AFM).	66
Figure 43 : Principe général du microscope à force atomique.	67

Figure 44 : Potentiel d'interaction pointe-surface et modes d'imagerie AFM	68
Figure 45 : Images AFM de topographie en mode contact d'assemblées cellulaires	69
Figure 46 : Image AFM de topographie en mode contact de protéines membranaires	69
Figure 47 : Principe du mode non-contact	70
Figure 48 : Image AFM en mode non-contact d'un cristal de Silicium (111)	70
Figure 49 : Mode non-contact et décalage en fréquence	71
Figure 50 : Phénomènes non-linéaires et déformation de la courbe de résonance en mode contact intermittent	73
Figure 51 : L'AFM vu comme une nanosonde : l'EFM	74
Figure 52 : Courbes d'approche-retrait et types d'interaction pointe-surface	75
Figure 53 : Dérive piézoélectrique et déformation des images AFM	76
Figure 54 : Etalonnage de la mesure en Z et non-linéarité	76
Figure 55 : Dilatation par la pointe AFM et élargissement des objets	77
Figure 56 : Contraste AFM et amplitude de l'oscillation	79
Figure 57 : L'érosion morphologique vue comme une modification de la topographie	80
Figure 58 : Image, objet binaire et connectivité	81
Figure 59 : Translation morphologique	82
Figure 60 : Erosion et dilatation morphologiques	83
Figure 61 : Ouverture et fermeture morphologiques	84
Figure 62 : Dilatation et distances géodésiques	85
Figure 63 : Squelette et amincissement	86
Figure 64 : Seuillage simple et seuillage à hystérésis	87
Figure 65 : Aplatissement des images AFM	89
Figure 66 : Etapes de la sélection des objets d'intérêts	90
Figure 67 : Exemple de pixel formant une épine	91
Figure 68 : Etapes de l'extraction des paramètres d'intérêts	93
Figure 69 : Analyse de mono-nucléosomes marqués par une streptavidine.	95
Figure 70 : Quelques éléments mesurés sur les chromatines	97
Figure 71 : Représentation d'une distribution avec une boîte glissante	99
Figure 72 : Exemples boîte glissante avec ou sans apodisation	100
Figure 73 : Exemple de boîte glissante 2D	100
Figure 74 : Structure du cristal de Muscovite (Mica)	101
Figure 75 : Mécanismes d'adsorption de l'ADN par les ions magnésium	102
Figure 76 : Diffusion 2D de molécules d'ADN visualisées par AFM	103
Figure 77 : Images AFM de molécules ADN à l'équilibre 2D ou projetées 3D/2D.	103
Figure 78 : Mécanisme d'adsorption de l'ADN par les polymères cationiques	104
Figure 79 : Effet de la densité en polyornithine sur la conformation de l'ADN déposé.	105
Figure 80 : Mécanismes d'adsorption de l'ADN par une surface AP-mica	106
Figure 81 : Exemple d'images AFM d'ADN et de complexes nucléo-protéiques déposés sur AP- mica	107
Figure 82 : Images de protéines membranaires photosynthétiques à très haute résolution.	108
Figure 83 : Image AFM de topographie d'une molécule d'ADN adsorbée sur une bicouche lipidique	108
Figure 84 : Constructions nucléosomales utilisées	111
Figure 85 : Nucléosomes conventionnels et cartes $L_c/\Delta L$	112
Figure 86 : Repliement des distributions de position	114
Figure 87 : Paramètres additionnels des mono-nucléosomes	115
Figure 88 : Images synthétiques de nucléosomes	119
Figure 89 : Cartes $L_c/\Delta L$ simulées montrant l'effet de différents paramètres	120
Figure 90 : Modélisation linéaire du mono-nucléosome	122
Figure 91 : Modélisation de la longueur d'ADN complexé du mono-nucléosome à l'équilibre	123

Figure 92 : Mono-tétrasomes purifiés	126
Figure 93 : Carte $L_c/\Delta L$ de tétrasomes	127
Figure 94 : Distribution de longueur complexée des mono-tétrasomes purifiés.	127
Figure 95 : Modélisation de la distribution de longueur complexée par le modèle linéaire.....	128
Figure 96 : Mono-nucléosomes conventionnels et histone de liaison	129
Figure 97 : Mono-nucléosomes variants H2A.Bbd et conventionnels H2A.....	130
Figure 98 : Distribution de longueur complexée L_c pour des nucléosomes variant H2A.Bbd et conventionnels H2A.	131
Figure 99 : Quelques exemples de chromatines conventionnelles	136
Figure 100 : Effet de l'histone de liaison H1 sur la compaction de la fibre conventionnelle	138
Figure 101 : Exemples de fibres conventionnelles H2A et variantes H2A.Bbd.....	139
Figure 102 : Deux paramètres extraits des images AFM pour les chromatines conventionnelles H2A et variantes H2A.Bbd	140
Figure 103 : Facteurs de structures, modèles de polymère et « Kratky plot ».....	142
Figure 104 : Représentation en Kratky plots des facteurs de structures expérimentaux pour les fibres conventionnelles et variantes	142
Figure 105 : Représentation en Kratky plots: effet du nombre de nucléosomes dans la fibre.....	143
Figure 106 : Ingrédients de la modélisation des fibres de chromatine.....	144
Figure 107 : Modèle géométrique pour la simulation de fibres de nucléosomes	145
Figure 108 : Exemple de "Kratky plots" pour des fibres modèles simulées.....	145
Figure 109 : Comparaison des kratky-plots expérimentaux et simulés	146
Figure 110: Prise en compte de l'attraction dans la simulation de fibres conventionnelles	147
Figure 111 : Exemples de chromatines chimères.....	149
Figure 112 : Effet de la flexibilité sur les kratky-plots expérimentaux et simulés	149
Figure 113 : Les paramètres dynamiques et structuraux du nucléosome influence les degrés supérieurs d'organisation de la fibre de chromatine.	150
Figure 114 : Protocole de l'expérience de remodelage	153
Figure 115 : Images AFM des nucléosomes avant et après réaction avec SWI/SNF.....	154
Figure 116 : Evolution cartes $L_c/\Delta L$ lors du remodelage par SWI/SNF.....	156
Figure 117 : Projection des cartes $L_c/\Delta L$ obtenues lors du remodelage par SWI/SNF.....	157
Figure 118 : Carte $L_c/\Delta L$ obtenue lors du remodelage par RSC.....	159
Figure 119 : Evolution des cartes $L_c/\Delta L$ lors de la réaction de remodelage par RSC en fonction du temps	160
Figure 120 : Evolution des cartes $L_c/\Delta L$ lors de la réaction de remodelage par RSC en fonction du ratio RSC/nucléosomes	161
Figure 121 : Evolution des cartes $L_c/\Delta L$ lors de la réaction de remodelage par RSC en fonction de la concentration en ATP	161
Figure 122 : Projection des cartes $L_c/\Delta L$ sur l'axe des positions pour l'action de remodelage par RSC en fonction du temps.....	162
Figure 123 : Segmentation des cartes $L_c/\Delta L$ et quantification des états au cours de la cinétique de glissement par RSC	163
Figure 124 : Modèle de la réaction de remodelage par SWI/SNF et RSC.....	164
Figure 125 : Distributions de position et de longueur complexée pour des mono-nucléosomes variants H2A.Bbd au cours du remodelage par SWI/SNF.....	165
Figure 126 : Distributions de position et de longueur complexée pour des mono-nucléosomes chimères Bbd.ddH2A au cours du remodelage par SWI/SNF	166
Figure 127 : Exemple d'images AFM de nucléosomes longs et asymétriques marqués par une streptavidine	167
Figure 128 : Les différentes constructions utilisées pour reconstituer des nucléosomes marqués asymétriques et symétriques.....	168
Figure 129 : Cartes $L_c/\Delta L$ de mono-nucléosomes marqués à l'équilibre	168

Figure 130 : Cartes $L_c/\Delta L$ pour des nucléosomes asymétriques marqués avant et après glissement par RSC	170
Figure 131 : Comptage des nucléosomes marqués glissés par RSC.....	171
Figure 132 : Repliement des cartes $L_c/\Delta L$ des nucléosomes marqués au cours du remodelage par RSC	171
Figure 133 : Principe de l'expérience de diffusion thermique du mono-nucléosome 'pompe' par RSC	173
Figure 134 : Cartes $L_c/\Delta L$ du glissement par RSC puis du retour à l'équilibre des mono-nucléosomes par diffusion thermique.....	174
Figure 135 : Energies d'interaction et de courbure	175
Figure 136 : Transitions autorisées dans le modèle	176
Figure 137 : Evolution des cartes $L_c/\Delta L$ 'synthétiques' en présence d'une force constante.....	177
Figure 138 : Construction utilisée pour les di-nucléosomes.....	179
Figure 139 : Exemples d'images AFM de les di-nucléosomes en présence de RSC sans ou avec ATP	180
Figure 140 : Les types d'états observés lors de l'action de remodelage par RSC sur des di-nucléosomes positionnés.	181
Figure 141 : Evolution de la proportion des différents types de di-nucléosomes au cours du remodelage par RSC.....	182
Figure 142 : Superposition de la cinétique et de la titration en RSC de la réaction de remodelage des di-nucléosomes.....	183
Figure 143 : Description des différentes étapes de la simulation à chaque itération	185
Figure 144 : Schéma cinétique général rendant compte de la simulation décrite.....	186
Figure 145 : Simulation avec le modèle simple isotrope et iso-productif	189
Figure 146 : Modification du schéma cinétique établi sur la Figure 144	189
Figure 147 : Comparaison des simulations pour plusieurs paramètres de $p_{\text{séquentiel}}$	190
Figure 148 : Comparaison des données expérimentales avec la simulation basée sur le modèle isotrope, iso-productif et séquentiel.	191
Figure 149 : Comparaison des simulations pour plusieurs paramètres de $p_{\text{change nuc}}$	192
Figure 150 : Comparaison des données expérimentales avec la simulation basée sur le modèle isotrope, séquentiel et non iso-productif	193
Figure 151 : Levée de dégénérescence de l'état 2	195
Figure 152 : Comparaison des données expérimentales et des données simulées à l'aide d'une chaîne de Markov	197
Figure 153 : Simulation du glissement de mono-nucléosomes marqués dans le cadre du modèle de glissement des di-nucléosomes.....	200
Figure 154 : Construction utilisée pour les tri-nucléosomes.....	201
Figure 155 : Images AFM des tri-nucléosomes à l'équilibre	201
Figure 156 : Images AFM de tri-nucléosomes au cours du remodelage par RSC.....	202
Figure 157 : Les deux configurations majoritaires des tri-nucléosomes glissés par RSC dans l'état stationnaire.....	203
Figure 158 : Images AFM de fibres de chromatine de 9 répétitions au cours du remodelage par RSC	204
Figure 159 : Kratky-plots des fibres de chromatines au cours du remodelage par RSC	205